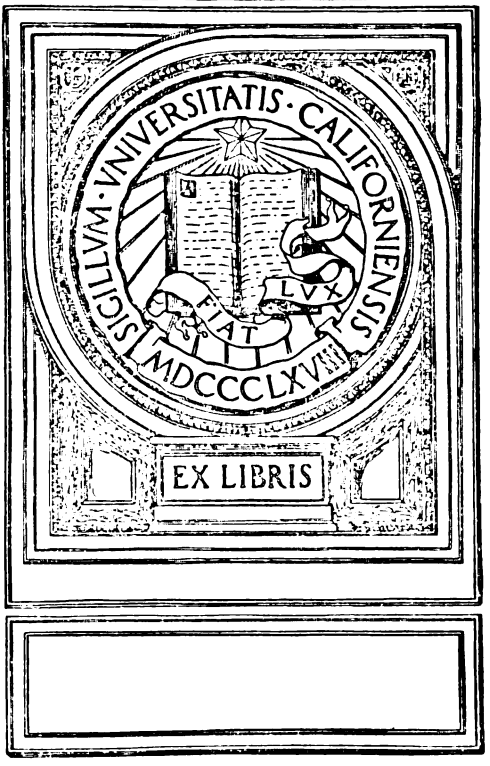
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundsiebzigster Band

Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

Seite

Borgert, H. und **K. Keitel.** Über die vasokonstriktorischen Substanzen im Blutserum 1

Masuda, Toshio. Über die Wirkung diuretischer Gifte auf die cyanvergiftete Froschniere. 8

Okuyama, Yoshimori. Versuche über die Empfindlichkeit der Blutgefäße des Frosches gegen Adrenalin 18

Köhler, Marialuis. Versuche über die Wirksamkeit der Nebenschilddrüsenauszüge des Handels 27

Kosterlitz, Hans und **Helmut Petow.** Einige Beobachtungen über das Verhalten der Esterase bei der Autolyse der Leber 31

Hartmann, Max und **Hans Isler.** Zur Kenntnis des Ovarialhormons 46

Wada, Hideo. Über den Einfluß der Fütterung mit aktivem und inaktivem Eisenoxyd auf den Harnquotienten C : N beim Kaninchen. 62

Blaschko, Hermann. Über den Mechanismus der Blausäurehemmung von Atmungsmodellen 68

Jacoby, Martin. Zur Kenntnis der Bedeutung der Blausäure bei der Metallvergiftung der Enzyme 79

Keitel, Karl. Über den Einfluß der experimentellen Säurevergiftung und der Nebennierenexstirpation auf die anorganischen Kationen des Blutserums 86

Brugsch, Theodor und **Hans Horsters.** Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVI. Glykolyse und Glykometamorphose, unter besonderer Berücksichtigung des Insulins 90

— — — — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVII. Myophosphat 115

Brugsch, Theodor, Melanie Cahen und **Hans Horsters.** Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVIII. Die Spaltung der Zymohexosediphosphorsäure durch die Muskulatur und ihr Spaltprodukt die Monohexosephosphorsäure 120

Brugsch, Theodor und **Hans Horsters.** Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XIX. Zum Mechanismus der Insulinwirkung 127

— — — — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XX. Der Wasserstoffexponent p_H des Vollblutes nach Insulininjektion beim Kaninchen 130

Zeller, Heinrich. Wirkung von Ammonsalzen auf die Hefegärung. IV. 135

Fellenberg, Th. von und **Gulbrand Lunde.** Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur. X. Beitrag zur Geochemie des Jods 162

Fehér, D. und **S. Vági.** Untersuchungen über die Einwirkung von Na_2CO_3 auf Keimung und Wachstum der Pflanzen. II. 172

Hergloz, Eugen. Neuere Untersuchungen über den Jodgehalt der Schilddrüse 175

Iwanoff, Nicolai N. Über Harnstoff bei Bakterien 181

Fuchs, Hans J. Über proteolytische Fermente im Serum. II. . . . 185

111750

Seite

Wohlgemuth, J. Die Fermente der Haut. V. Atmung und Glykolyse der Haut und ihre Beeinflussung durch Hormone von E. Klopstock 202
— — Die Fermente der Haut. VI. Über das Verhalten der Lipase und über das Vorkommen von Phosphatase, Sulfatase und Carboxylase in der Haut von Yasuo Nakamura 216
Wohlgemuth, J. und **Y. Nakamura.** Über den Zuckerabbau im Zentralnervensystem des Menschen 233
Takane, Kazuji. Über die vermeintliche Hydrolyse der Stärke durch Salze und Eiweißabbauprodukte 241
Rona, Peter und **Margot Sperling.** Untersuchungen über den Blutzucker. X. Mitteilung: Über die Verteilung der Glucose auf Plasma und Blutkörperchen 253
Prát, Silvestr. Die Anwendung der polarographischen Methodik in der Biologie 268
Abelin, I. Zur Kenntnis des Kohlehydratstoffwechsels. I. Mitteilung: Über die Bedeutung des Phosphats für den Umsatz der Kohlehydrate 274
Hägglund, Erik und **Truls Rosenqvist.** Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. V. 293
Theorell, A. Hugo T. Über quantitative Bestimmung der Lipoide der aus Pferdeplasma ausgesalzten Eiweißkörper 297
Kanamori, Torao. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß vitaminreicher, mineralstoffarmer Ernährung auf den Stoffwechsel und die Lage des Harnquotienten C : N 318
— — Notiz über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei der Phenylhydrazinanämie 330
Zelinsky, N. D. und **Sch. R. Zinzadze.** Eine neue Methode der quantitativen Fettbestimmung in der tierischen Substanz und in ganzen Organismen 335
Brehme, Th. und **B. Brahdy.** Zur Frage der Milchsäurebestimmung in kleinen Blutmengen, Modifikation der Clausenschen Methode 348
Snapper, J. und **A. Grünbaum.** Über die Methodik der β-Oxybuttersäurebestimmung in Leber und Muskeln 357
— — — — Über den β-Oxybuttersäuregehalt von Muskeln und Leber 366
Dische, Zacharias und **Hans Popper.** Über eine neue kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Kohlehydrate in Organen und Körpersäften 371
Dische, Zacharias und **Daniel Laszlo.** Über das glykolytische Vermögen tierischer Organe beim Carcinom 412
Fischer, Anton. Zur Bestimmung des Fettsäuregehalts von Organen 449
Groák, B. Mikrogesamtjodbestimmung und Jodbestimmung in organischen Säuren 455
Jendrassik, L. und **E. Moser.** Die Calciumionisation in physiologischen Lösungen 461
Steppuhn, O., G. Pewsner und **A. Timofejewa.** Über das Wesen der Autolyse. VI. Mitteilung: Die Autoproteolyse ganzer Tierkörper unter verschiedenen Bedingungen 471
Rubentschik, L. Über Ureasebildung durch Bakterien bei Nichtvorhandensein von Harnstoff 482
Müller, Elisabeth. Über die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker in vitro 491
Autorenverzeichnis 496

Biochemische Zeitschrift

MEDICAL CENTER LIBRARY
JAN 2 1962
San Francisco, 22

Unter Mitwirkung von

M. Asculi-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, S. M. Dubiski-Berlin, R. Dearr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, M. Löwy-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, F. Rona-Berlin, M. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, M. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundsiebzigster Band

Erstes bis drittes Heft

Abgeschlossen am 23. August 1926

Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt ℳ 28,—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Das Honorar beträgt ℳ 40,— für den 16 seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

175. Band. Inhaltsverzeichnis. Heft 1/3.

Seite

Borgert, H. und **K. Keitel.** Über die vasokonstriktorischen Substanzen im Blutserum 1

Masuda, Toshio. Über die Wirkung diuretischer Gifte auf die cyanvergiftete Froschniere. 8

Okuyama, Yoshimori. Versuche über die Empfindlichkeit der Blutgefäße des Frosches gegen Adrenalin 18

Köhler, Marialuis. Versuche über die Wirksamkeit der Nebenschilddrüsenauszüge des Handels 27

Kosterlitz, Hans und **Helmut Petow.** Einige Beobachtungen über das Verhalten der Esterase bei der Autolyse der Leber 31

Hartmann, Max und **Hans Isler.** Zur Kenntnis des Ovarialhormons 46

Wada, Hideo. Über den Einfluß der Fütterung mit aktivem und inaktivem Eisenoxyd auf den Harnquotienten C : N beim Kaninchen. 62

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über die vasokonstriktorischen Substanzen im Blutserum.

Von

H. Borgert und **K. Keitel.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der Hamburgischen Universität.)
(Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 10. Mai 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Es war schon in der Mitte des vorigen Jahrhunderts die Beobachtung gemacht, daß Blutserum auf Gefäßpräparate derart einwirkt, daß die Gefäße sich kontrahieren.

Bei der Suche nach der Ursache glaubten *Cybulsky* und *Szymonowicz* (1), *Oliver* und *Schäfer* (2), *Kretschmer* (3) und andere die Kontraktion auf in der Blutbahn kreisendes Adrenalin zurückführen zu können. Diese Vermutung wurde jedoch von *O'Connor* (4) und *Trendelenburg* (5) durch Versuche mit synthetischem Adrenalin widerlegt, wobei sie nachweisen konnten, daß der kontrahierende Stoff im Blutserum anderer Natur sein müsse. Versuche an Darm-, Harnblase-, Placentar- und Coronargefäßen erwiesen die Verschiedenheit.

Die Eigenschaften und die Natur dieses gefäßkontrahierenden Stoffes sind seitdem mehrfach, so von *O. B. Meyer* (6) und anderen, untersucht worden, doch sind die Ergebnisse noch sehr wechselnd. Die nachfolgenden Beobachtungen sollen einen weiteren Beitrag zu dieser Frage liefern.

Methodik.

Wir benutzten bei unseren Versuchen die *Laewen-Trendelenburg*sche Versuchsanordnung am überlebenden Gefäßmuskelpräparat des Frosches. Zur Verwendung gelangten fast ausschließlich Temporarien, sowohl Sommer- als auch Wintertiere. (In Übereinstimmung mit *Trendelenburg* und anderen Autoren erwiesen sich die Winterfrösche als wesentlich weniger empfindlich!).

Die Versuche wurden so angestellt, daß wir mit einer Adrenalininjektion 1 : 30 Millionen begannen, dann Serum (in wechselnden Mengen 1 : 10 mit Froschringer verdünnt) und zur Kontrolle der Empfindlichkeitskonstanz mit einer Adrenalininjektion (s. oben) schlossen. Als Maß der

Stärke der Kontraktion diente uns die Zeit, die 10 Tropfen zum Ausfließen gebrauchten: die Zeitzunahme trugen wir als Ordinate, die Dauer der Ablesung in Minuten als Abszisse ein (und zwar die Kontraktionen als positiv nach oben, die Dilatationen als negativ nach unten) und erhielten so übersichtliche Kurven. Verwendet wurde Rinder-, Hunde-, Gänse- und Menschenserum.

Versuche.

Bevor wir den Stoff zu isolieren versuchten, orientierten wir uns zunächst über die Entstehung, Zersetzlichkeit und sonstigen allgemeinen Eigenschaften der gesuchten Substanz.

Da von einigen Autoren, besonders von *O'Connor* (7), *Trendelenburg* und *Freund* (11) angenommen wurde, daß die gefäßverengernde Substanz bei der Blutgerinnung, und zwar durch den Zerfall der Blutplättchen entsteht, haben wir mit entsprechenden Versuchen begonnen.

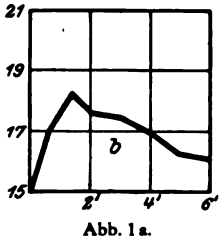


Abb. 1 a.
0,5 ccm Gänseplasma
1:10 ccm.

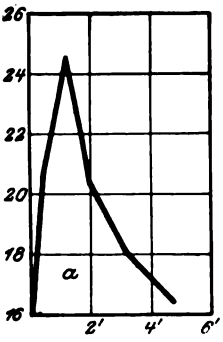


Abb. 1 b.
0,5 ccm Gänseserum
1:10 ccm.

Wir verwandten Gänseblut, wegen der bei diesem nur sehr verzögert eintretenden Gerinnung und der damit gewonnenen Möglichkeit, die sonst gleichzeitig verlaufenden Vorgänge des Thrombocytenzerfalls und der Gerinnung in ihrer Wirkung getrennt zu beobachten.

Das Ergebnis war für Plasma ein stärkerer Ausschlag als für Serum (Abb. 1). Man konnte mithin annehmen, daß die fragliche Substanz zu einem Teile bei der Gerinnung zerstört oder vom Gerinnsel adsorbiert wird. Auskunft darüber gibt eine Versuchsreihe an Rinderblut, das mit Glasperlen geschüttelt war. Aus dem Gerinnsel wurde durch leichten Druck das eingeschlossene Serum ausgepreßt, zur Entfernung der Blutkörperchen zentrifugiert und mit dem auf gewöhnliche Weise gewonnenen Serum des gleichen Blutes verglichen. Es ergab sich, daß das im Koagulum eingeschlossene Serum mehr gefäßkontrahierende Substanzen enthielt als das Vergleichsserum. *Der Thrombozytenzerfall scheint also für die Entstehung der vasokonstriktorischen Wirkung von Bedeutung zu sein*; der Akt der Gerinnung reißt einen Teil der Substanz mit zu Boden. In analoger Weise wird bei der Eiweißgerinnung ein Teil der Substanz unwirksam (s. später).

Der nächste Schritt war nun, die Frage der Zersetzlichkeit zu prüfen. Wir ließen Serum, dessen anfänglichen Ausschlag wir festgestellt hatten, 24 Stunden lang stehen und konnten

beobachten, daß das Serum nach dieser Zeit wesentlich schwächer wirksam geworden war, in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle sogar eine Dilatation hervorrief (Abb. 2).

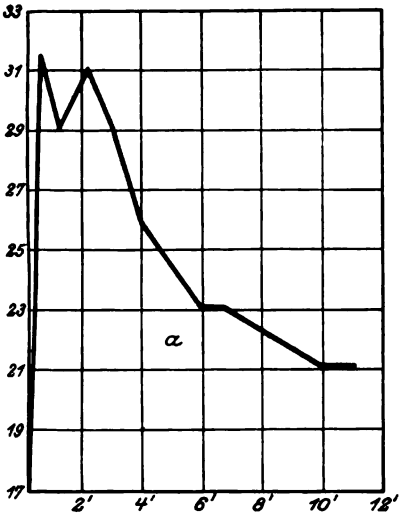


Abb. 2a.
0,5 ccm Rinderserum, frisch I : 10.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen *A. Fraenkels* (8), während *F. Löhning* (9) und *Trendelenburg* (10) eine Beständigkeit feststellten. *Anscheinend findet also eine Zersetzung der vasokonstriktorischen Substanz statt*, wodurch dann eine wahrscheinlich von Anfang an vorhandene dilatierende Substanz sichtbar geworden sein könnte[1]).

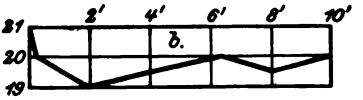


Abb. 2b.
0,5 ccm Rinderserum, 24 Stunden alt I : 10.

Weiter kamen nun für die Zersetzlichkeit in Frage: Licht, Wärme, Luftsauerstoff und Bakterien; einen nennenswerten Unterschied oder irgend eine gesetzmäßige Änderung gegenüber dem ursprünglichen Ausschlag wiesen dementsprechend behandelte Sera nicht auf. Allenfalls zeigten die bakteriologischen Versuche eine, wenn auch nur geringe Differenz zwischen dem sterilen und dem nicht sterilen, offen stehengelassenen Serum. Jedoch waren auch diese Differenzen zu minimal, um den Befunden einen entscheidenden Wert beimessen zu dürfen.

Hatten wir so einige, wenn auch schwache Hinweise erhalten betreffs der möglichen Fehlerquellen für die Isolierung, so versuchten wir diese selbst nun auf vier verschiedenen Wegen:

I. durch Dialyse,
II. „ Filtration (nach Enteiweißung),
III. „ Extraktion,
IV. „ Destillation.

---

[1]) Daß die vasokonstriktorische Substanz auch durch gewisse überlebende Organe leicht zerstört wird, hat *Starling* für die Lunge, *Bornstein* (Verh. d. deutsch. pharm. Ges. 1925) für die Leber festgestellt.

I. Dialyse.

Eine reinliche Trennung von den großen Eiweißmengen des Serums war am besten auf dem Wege der Dialyse zu erreichen, da Eiweiß bekanntlich nicht dialysabel ist und dagegen der gesuchte Stoff von *Löhning*, *Dittler* und *Trendelenburg* als sehr wohl dialysabel beschrieben war.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: 5 ccm Serum wurden in einer Dialysierhülse gegen 15 ccm Froschringerlösung 6 Stunden dialysiert und dann auf 50 ccm mit derselben Lösung aufgefüllt. Die Injektionen zeigten das Dialysat durchaus wirksam im Sinne einer Gefäßkontraktion (Abb. 3).

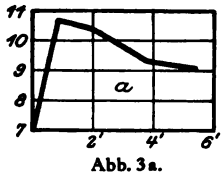


Abb. 3a.
0,5 ccm Adrenalin
1:30 ccm.

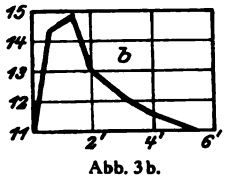


Abb. 3b.
0,5 ccm Menschenserum
1:5 ccm.

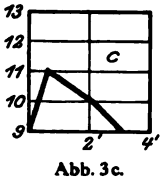


Abb. 3c.
0,5 ccm Menschenserum,
Dialysat 1:5 ccm.

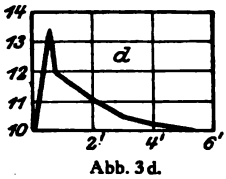


Abb. 3d.
0,5 ccm Menschenserum,
aus der Dialysierhülse
1:5 ccm.

Es war jedoch nicht möglich, durch Erneuerung der umgebenden Dialysierflüssigkeit *eine Anreicherung* oder gar Erschöpfung des angesetzten Serums *zu erzielen*. Da endlich eine Ausdehnung des Dialysierens auf 24 Stunden im Gegensatz zu den Befunden *Dittlers*, der 115 Stunden dialysierte, sich als ganz ungeeignet erwies, gingen wir ohne weiteres dazu über, das Eiweiß durch Fällung aus dem Serum herauszubringen (Filtration).

II. Filtration.

5 ccm Serum wurden nach der Vorschrift von *Folin* nach Zusatz von 35 ccm (im Verhältnis 7 : 9 verstärkter) Ringerlösung durch 5 ccm 10proz. Natriumwolframatlösung und 5 ccm $^2/_3$ n H_2SO_4 enteiweißt. Das *Filtrat* hiervon wurde sodann als solches zur Injektion benutzt und *erwies sich als wirksam* (Abb. 4).

Jedoch waren die erhaltenen Ausschläge so gering, daß wir diese Methode zunächst nur deshalb beibehielten, weil sie gegenüber dem Dialysierverfahren einen großen Zeitgewinn darstellte. Wir konnten nämlich hoffen, daß wir unter Verwendung größerer Mengen Serums durch Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel schließlich doch

eine Isolierung und möglicherweise sogar eine Anreicherung bewirkten. Dementsprechend versuchten wir mit Äther und Aceton zu extrahieren.

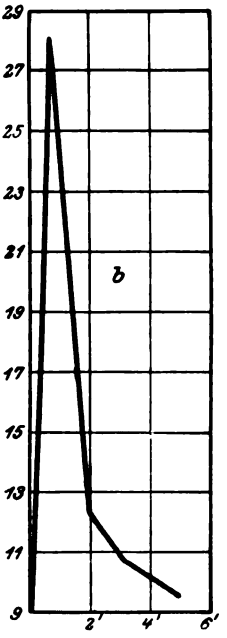


Abb. 4b.
1,0 ccm Rinderserum I : 10 ccm.

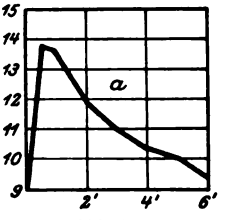


Abb. 4a.
0,5 ccm Adrenalin I : 30 ccm.

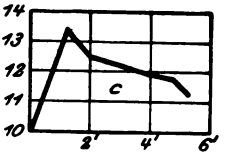


Abb. 4c.
1,0 ccm Filtrat I : 10 ccm.

III. Extraktion.

Das nach *Folin* erhaltene Filtrat wurde mit n/10 Natronlauge genau neutralisiert und sodann durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther extrahiert. Der Äther wurde aus einem lauen Wasserbad abdestilliert und der Rückstand (wie dies auch mit allen folgenden Extraktionsrückständen gemacht wurde) mit Froschringerlösung auf das Volumen des angewandten Serums aufgefüllt. Überraschenderweise zeigte sich jetzt aber ein negativer Ausschlag, eine Dilatation. Da der Gedanke nahe lag, daß es sich ähnlich dem Adrenalin um einen basischen Stoff handeln könnte, versuchten wir den Stoff dadurch zu gewinnen, daß wir ihn aus 1proz. natronalkalischer Lösung ausätherten. *Auch in diesem Falle* ergab sich aber *nur ein äußerst geringer positiver Ausschlag.*

Da Äther als Lösungsmittel ungeeignet sein konnte, gingen wir zu Aceton über. Dazu war natürlich [wegen der Mischbarkeit des Acetons mit Wasser] nötig, das Filtrat vorher einzudampfen und nur den Salzrückstand zu extrahieren. Um die Gefahren der Überhitzung auszuschließen, nahmen wir diese Eintrocknung sowohl mit Hilfe des Vakuums, als auch des *Faust-Heim*schen Apparats vor. (Sonst wurde unter gleichen Bedingungen gearbeitet.) Aber auch *die Acetonextrakte fielen ähnlich aus,* wie die Ätherversuche.

Während aber nun die Ätherversuche mit ihren positiven und negativen Ausschlägen und die Tatsache, daß trotz negativen Filtrats doch der basische Ätherextrakt *positiv* erhalten wurde, dafür sprachen, daß mehr irgendwelche anderen Umstände für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden könnten, ließ die Verarbeitungstechnik auf Acetonextrakte vermuten, daß der gesuchte Stoff sich verflüchtigt haben könnte. Deswegen versuchten wir auch in dieser Richtung Klarheit zu schaffen.

IV. Destillation.

Zu diesem Zwecke wurden die übergehenden Dämpfe durch Eiskühlung kondensiert. (Im weiteren Verlauf wurde auch noch mit einer Vorlage von n/100 H_2SO_4 bzw. NaOH gearbeitet, je nachdem, ob das zu destillierende Filtrat von uns alkalisch gemacht oder angesäuert worden war.) *Wir erhielten so im allgemeinen einen schwach positiven Ausschlag.*

Wenn wir jedoch das Filtrat (peinlichst genau wieder neutralisiert) als solches zur Injektion verwandten, so ergab dieser Ausschlag — mit dem des Destillats summiert — doch nicht den Ausschlag des ursprünglichen Serums. Auch einige *Versuche*, dort, wo ein positiver Ausschlag sich zeigte, durch Verwendung weniger starker Verdünnungen, also *stärkerer Konzentrationen* eine Summierung zu erzielen, *schlugen fehl*, ergaben sogar in den meisten Fällen eine Verminderung der Kontraktion.

Angesichts dieser so wechselnden und schwer erklärlichen Ergebnisse begannen wir alle Versuche als *Leerversuche* (d. h. unter Verwendung von Ringerlösung statt des Serums) zu wiederholen. Außer den Dialysierversuchen, die in schöner Weise ohne Ausschlag blieben, gaben diese Versuche *im allgemeinen überraschenderweise in allen Phasen dieselben Resultate*:

Die Extraktionsversuche mit Aceton und Äther Dilatation, die Destillationsversuche einwandfrei Kontraktion, d. h. positive Ausschläge.

Man sieht also, daß es nicht ohne weiteres angängig ist, auf dem bisher beschrittenen Wege in der Auffassung des Problems fortzufahren. Zwar lassen sich die Dialysierversuche schwer anders interpretieren, als daß man einen Körper mit gefäßkontrahierenden Eigenschaften annimmt, zumal ja auch die diesbezüglichen Blindversuche mit Ringerlösung einwandfrei wirkungslos blieben. Doch gibt die Fülle der anderen Ergebnisse ein zu sehr entgegengesetztes Bild, als daß man an diesen Tatsachen kritiklos vorübergehen dürfte. Die Arbeiten der verschiedensten Autoren vermögen kein einheitliches Bild zu geben. Unsere eigenen Versuche, insbesondere die eben besprochenen Blindversuche, weisen auf einige Fehlerquellen hin, die vielleicht manche dieser Widersprüche klären können.

Wenn sich auch im speziellen in dieser Hinsicht keine genauen Angaben machen lassen, so glauben wir doch, mit dem Vorliegenden unter anderen einige große Gefahrenquellen, wenn auch nicht aufgedeckt, so doch wenigstens umrissen zu haben. Auch ist es durch die Kontrollversuche sehr wahrscheinlich geworden, daß ein großer Teil

der in der Literatur verzeichneten Befunde nur Scheinresultate darstellen oder doch zum mindesten nicht ohne weiteres die daraus gezogenen Schlüsse rechtfertigen.

Zusammenfassung.

1. Es werden am *Laewen-Trendelenburg*schen Präparat Versuche mit Seruminjektionen angestellt, die eine Kontraktion der Gefäße erkennen lassen.

2. Zur Frage über den Einfluß von Thrombocytenzerfall und Gerinnung:

a) im Gänseblut tritt Thrombocytenzerfall sofort, Gerinnung erst nach längerer Zeit, etwa 1 Stunde, ein. So gewonnenes Gänseplasma enthält mehr vasokonstriktorische Substanz als Gänseserum.

b) Bei Koagulation des Säugetierblutes ist im Serum, das aus dem Koagulum ausgepreßt wird, weniger vasokonstriktorische Substanz enthalten als im Serum, das aus dem überstehenden Blute gewonnen wird.

Aus diesen beiden Versuchsreihen folgt, daß bei der Koagulation ein großer Teil der vasokonstriktorischen Substanz niedergerissen wird.

3. Eine deutliche Abhängigkeit von Licht, Wärme, Luftsauerstoff und Bakterien war nicht nachweisbar; hingegen war eine Abhängigkeit von der Zeit festzustellen, indem nach 24 Stunden die vasokonstriktorische Substanz ganz oder teilweise aus dem Serum verschwunden war und das Präparat mit einer Gefäß*erweiterung* reagierte.

4. Der vermutete Stoff ist dialysabel, mit Äther wie auch mit Aceton jedoch nicht extrahierbar und auch nicht abdestillierbar.

5. Es wird auf eine Anzahl Fehlerquellen hingewiesen, die sich von entscheidendem Einfluß erweisen können, wenn man Stoffe, die durch chemische oder physikalische Maßnahmen aus Serum gewonnen werden, auf das *Laewen-Trendelenburg*sche Froschpräparat wirken läßt.

Literatur.

1) *Cybulsky* und *Scymonowicz*, Pflügers Arch. **64**, 97, 1896. — 2) *Oliver* und *Schäfer*, Journ. of Physiol. **18**, 230, 1899. — 3) *Kretschmer*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **57**, 423, 1907. — 4) *O'Connor*, ebendaselbst **67**, 206. — 5) *Trendelenburg*, Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 36. — 6) *O. B. Meyer*, Zeitschr. f. Biol. **82**. — 7) *O'Connor*, Münch. med. Wochenschr., S. 1439. — 8) *Fraenkel*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **60**, 595. — 9) *Loehning*, Zeitschr. f. Biol. **62**, 65. — 10) *Trendelenburg*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **63**, 170. — 11) *Freund*, ebendaselbst **91**, 276.

Über die Wirkung diuretischer Gifte auf die cyanvergiftete Froschniere.

Von

Toshio Masuda.

(Aus dem pharmakologischen Institut Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 21. Mai 1926.)

Die Froschniere ist oft zum Studium diuretischer Substanzen verwendet worden, weil sie verhältnismäßig leicht überlebend erhalten werden kann und durch die eigenartige Anordnung ihrer zuführenden Gefäße eine getrennte Beeinflussung der Tätigkeit der Glomeruli oder Tubuli erlaubt. So haben z. B. *Cullis* (1), *Bainbridge*, *Collins* und *Menzie* (2), *Rowntree* und *Geraghty* (3) und *Halsey* (4) — um nur die pharmakologischen Untersuchungen herauszugreifen — diese anatomischen Verhältnisse ausgenutzt, um am lebenden Frosch oder an dem isoliert durchströmten Organ die Wirkung von Coffein, Theobromin und Harnstoff zu untersuchen, indem sie durch Unterbindung eines der zuführenden Gefäße den zugehörigen Nierenabschnitt auszuschalten suchten und die Giftwirkung auf den noch intakten Abschnitt beobachteten, oder indem sie, bei erhaltener Zirkulation beider Gefäße, die Giftlösung nur durch eines der Gefäße zuführten und so nur auf einen Teil der Nierenzellen das Gift wirken ließen. Das Resultat dieser Untersuchungen läßt sich dahin zusammenfassen, daß die Glomeruli unbedingt für die Harnbildung notwendig sind, und daß Harnstoff nur bei Perfusion durch den Glomerulus diuretisch wirkt [*Cullis* (1)]. Gegen die Versuche, die Tubuli durch Unterbindung der Nierenpfortader auszuschalten, liegt ein Einwand vor, der sich auf die anatomischen Verhältnisse stützt, denn nach Austritt aus dem Glomerulus teilt sich das Vas eferens, bildet einige Kapillaren, die sich um den dem Glomerulus am nächsten gelegenen Tubulusabschnitt winden, und vereinigt sich dann mit den Pfortaderkapillaren zur gemeinsamen Vene. *Cushny* (5) hält deshalb nur die Unterbindung der Nierenarterie für beweisend, wenn nachträglich eine mikroskopische Kontrolle die Glomeruli durch Blutkoagula verschlossen findet, während eine Unterbindung oder Durchströmung der Nierenpfortader allein den beabsichtigten Zweck, nur

die Tubuluszellen zu vergiften, wegen der kollateralen Versorgung vom Glomerulus aus nicht ausreicht. Dem Wunsche, die Analyse der Wirkung von diuretischen Substanzen zu vertiefen, die von *Schmidt* (6) und *Hartwig* (7) an der Froschniere festgestellt ist, kommen die Beobachtungen von *Starling* und *Verney* (8) und den Mitarbeitern *Hoebers* (9 bis 12) zu Hilfe, die an der isolierten Warmblüterniere und an der Froschniere durch Narkotica oder Blausäure eine Aufhebung der Konzentriertätigkeit oder beim Frosch eine Aufhebung der Verdünnungstätigkeit feststellten. Eine Niere, die auf diese Weise in ihrer Tätigkeit, aus dem Glomerulusfiltrat Salze zu resorbieren, gelähmt ist, soll je nach der Konzentration und Art des Narkoticums ein mehr oder weniger reines Glomerulusfiltrat liefern. Auf Grund dieser Beobachtungen und Folgerungen scheint die Möglichkeit vorhanden zu sein, die Tätigkeit der Tubuluszellen durch Blausäure besser als durch die Pfortaderunterbindung auszuschalten, und die Gelegenheit geboten, für die Diuretica durch vergleichende Untersuchung an normalen und vergifteten Nieren eine Wirkung auf den Glomerulus und den Tubulus zu trennen. Würde z. B. bei einer cyanvergifteten Niere ein Diureticum doch noch wirken, so würde das als eine Wirkung auf den Glomerulus anzusprechen sein, würde aber die Wirkung ausbleiben, so wäre damit die Unwirksamkeit des Diureticums auf den Glomerulus festgestellt und eine Wirkung auf die Tubuluszellen wahrscheinlich gemacht.

Dieser Versuch ist im folgenden für die Diuretica Coffein, Sublimat und Harnstoff gemacht worden, deren Wirkung

1. an der normalen, mit Sauerstoff versorgten Niere,

2. an der cyanvergifteten Niere und

3. an der durch Sauerstoffabschluß anoxybiotisch gemachten Niere verglichen worden ist. In allen diesen Versuchen wurde a) die stündliche Harnmenge, b) die Cl-Konzentration des Harns gemessen und c) um einen Anhalt über die Gefäßreaktion beider Nierenabschnitte zu gewinnen, die stündlich durch die Nierenarterie und Nierenpfortader einfließende Menge Salzlösung bestimmt, d) wurde die Niere auf Zuckerdurchlässigkeit geprüft.

Methodik.

In der Präparation haben wir uns an die Angaben von *Bainbridge, Cullins* und *Menzie,* (2) gehalten und beide Nieren des Frosches von der Arterie und Pfortader aus mit einem Druck von 24 cm und 12 cm Wasser getrennt durchströmt Die häufig beschriebenen (1 bis 4, 6 bis 12) Einzelheiten der Methode sollen hier nicht wiederholt werden. Die aus zwei graduierten *Mariotte*schen Flaschen in die Nierenarterie bzw. Nierenpfortader fließenden Mengen der verwendeten Salzlösung wurden stündlich abgelesen. Dabei findet aber auch bei sehr sorgfältiger Abbindung aller Seitenäste ein gewisser Verlust statt. Kontrollversuche ergeben für die aus der Vena cava fließende Menge einen wechselnden Fehlbetrag von 2 Pro z

bis maximal 20 Proz. der durch beide Gefäße stündlich eingeflossenen Lösung, so daß die stündlich aus den *Mariotte*schen Flaschen fließenden Mengen wohl einen angenäherten, aber keinen quantitativen Wert für die Gefäßweite in der Niere geben.

Als Durchströmungsflüssigkeit wurde die von *Barkan*, *Brömser* und *Hahn* (13) verbesserte Froschringerlösung verwendet; vor jedem Versuch wurde die aus den Stammlösungen frisch hergestellte Mischung mit dem angegebenen Kohlensäure-Sauerstoffgemisch mehrmals gründlich durchgeschüttelt. Auch während des Versuchs perlte das Kohlensäure-Sauerstoffgemisch mit geringem konstantem Überdruck in die *Mariotte*schen Flaschen nach. Die Wasserstoffzahl der Durchströmungsflüssigkeit wurde kolorimetrisch nach *Michaelis* gemessen und betrug in den Versuchen mit und ohne Sauerstoff und mit Cyannatrium $p_H = 7{,}40$.

In beide Ureteren wurde je eine kleine Kanüle eingeführt, die den Harn in kleine Meßzylinder oder (von Versuch 73 ab) durch einen kurzen Gummischlauch in eine 1 ccm mit $^1/_{100}$ ccm untergeteilte Pipette leitete. In den Tabellen wird die stündliche Harnmenge beider Nieren gemeinsam, sowie ihre Cl-Konzentration angeführt. Die Chlorbestimmung wurde nach *Ruszniak* (14) vorgenommen. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit der im Versuch befindlichen Niere wurde im Harn eine qualitative Glucosebestimmung nach *Nylander* ausgeführt.

Für die Blausäureversuche wurde mit der Durchströmungsflüssigkeit eine m/1000 oder m/2000 NaCN-Lösung hergestellt und damit beide Nierengefäße durchströmt. Auf diese Weise erreicht man nach den Angaben *Davids* (10) eine vollkommene Ausschaltung der Fähigkeit der Tubuluszellen, Salze und organische Bestandteile des Glomerulusfiltrats wieder zu resorbieren. Daß dabei die Tubuluszellen in unseren Versuchen irreversibel geschädigt sind, ist für die folgenden Versuche ohne Bedeutung, da man aus *Davids* (10) Versuchen an Nieren, deren Tubuluszellen durch Narkotica gelähmt sind, keinen Einfluß der Blausäure auf die Funktionen der Glomeruli erkennen kann.

Für die Anoxybioseversuche bedurfte es weiterer Maßnahmen. Das zur Herstellung der modifizierten Ringerlösung verwendete destillierte Wasser wurde entweder vorher tüchtig ausgekocht oder mit einer Vakuumölpumpe in einem geschlossenen Gefäß mehrfach evakuiert und dann mit Wasserstoff oder Stickstoff wieder gesättigt. Die fertiggestellte Ringerlösung wurde dann mit einem Stickstoff-Kohlensäuregemisch durchgeschüttelt und durchperlt. Gegen den Sauerstoff der Atmosphäre wurde das Nierenpräparat mit flüssigem Paraffin überschichtet, nachdem die Kanülen eingebunden waren. Diese vorsichtigen Maßnahmen erwiesen sich im Verlaufe der Versuche als überflüssig, denn die Nierenzellen sind gegen Sauerstoffmangel so empfindlich, daß schon die Verwendung von gekochtem Wasser zum vollen Erfolg, der Aufhebung der Verdünnungstätigkeit der Niere, führt.

Versuche.

Den Diureseversuchen seien in Tabelle I einige Normalversuche vorausgestellt, die zum Vergleich dienen und den Einfluß von Sauerstoffmangel und Blausäure erläutern sollen. Es erübrigt sich, mehr als je einen Versuch anzuführen, da sich dieselben Befunde bei den Diureseversuchen wiederholen und außerdem derartige Versuche bereits beschrieben sind.

Tabelle I.

Normalversuche.

Versuch	Datum	Arterie ccm/h	Pfortader ccm/h	Harnmenge ccm/h	Cl-Konzentration Proz	Bemerkungen
	1924					
48	19. XII.	40	77	0,25	0,29	Versuch mit Sauerstoff
		17	65	0,26	0,24	
		14	30	0,26	0,24	
		14	?	0,50	0,23	
	1925	12	76	0,40	0,24	
114	20. III.	50	60	0,58	0,42	Versuch mit Anoxybiose
		48	46	1,50	0,42	
		36	42	1,90	0,42	
		31	29	1,60	0,42	
		37	61	1,60	0,42	Zucker +
82	19. II.	6,5	53	0,26	0,21	Versuch mit Cyan
		85,0	85	0,51	0,11	
		m/2000 NaCN-Ringerlösung.				
		26,5	65	1,90	0,24	
		35,0	65	1,40	0,32	Zucker ±

Die mit Sauerstoff versorgte Niere (Versuch 48) liefert über Stunden hinaus ziemlich konstante Mengen gleichmäßig hypotonischen Cl-armen, zucker- und eiweißfreien Sekrets. Dieses ist als Produkt der Verdünnungstätigkeit der Froschniere anzusehen, wie es den Lebensbedingungen des Frosches, große Wasserzufuhr bei geringer Salzzufuhr, entspricht. Die Gefäßweite des Nierenarteriensystems bleibt ungefähr gleich groß, während die Weite des Pfortadersystems größeren unbekannten Schwankungen unterliegt.

Sauerstoffmangel (Versuch 114) führt zu einer Zunahme der stündlichen Harnmenge zu einem Anstieg der Cl-Konzentration fast bis zu den Cl-Werten der Durchströmungsflüssigkeit. Das Sekret bleibt meistens zuckerfrei und der Kreislauf wird durch die Anoxybiose nicht wesentlich beeinflußt.

Cyannatrium in einer m/2000 bis m/1000 Konzentration führt in den meisten Versuchen (15 von 25) zu einem Anstieg der Harnmenge, die von einem Anstieg der Cl-Konzentration begleitet ist. *Starling* beobachtete ebenfalls eine geringe Diuresezunahme nach Cyan. *David* (10) hingegen schließt aus seinen Versuchen, daß Blausäure die Harnmenge nicht ändere[1]). Unter Einfluß von Cyannatrium kommt es in den meisten Fällen zu einer Gefäßerweiterung. In 16 von 23 einwandfreien Versuchen fand eine Erweiterung der Nierenarteriengefäße und in 12 eine der Pfortadergefäße statt.

[1]) Obgleich in seinen Versuchen (Arch. f. d. ges. Physiol. 208, 146, 1925) (Versuch 12, 13, 25, 37, 39) ein Anstieg der Harnmenge, aber ebenfalls wie bei uns nicht regelmäßig, zu beobachten ist.

Die Versuche, in denen die Diuretica Coffein, Sublimat und Harnstoff angewendet wurden, sind für jedes einzelne Diureticum getrennt zusammengestellt worden. Es werden aber nicht alle Versuche angeführt werden, sondern nur drei von jeder Art.

Tabelle II.

Coffeinversuche.

Versuch	Datum 1925	Arterie ccm/h	Pfortader ccm/h	Harnmenge ccm/h	Cl-Konzentration Proz.	Bemerkungen
87	23. II.	26	18	0,55	0,16	Versuch mit Sauerstoff
		Coffein natr. salicyl. 1:500 000.				
		27	62	0,60	0,22	
		23	62	0,85	0,23	Zucker ±
118	26. III.	49	37,5	0,19	0,30	Versuch mit Anoxybiose
		Coffein natr. salicyl. 1:500 000.				
		55	54,5	0,25	0,36	
		40	59,5	0,23	0,36	
122	27. III.	46	8	1,9	0,39	Versuch mit Anoxybiose
		38	45	2,4	0,42	
		Coffein natr. salicyl. 1:500 000.				
		29	12	2,8	0,42	
		30	60	3,3	0,44	Zucker +
61	27. I.	26	55	0,6	0,18	Versuch mit Cyan
		25	47	0,4	0,29	
		m/2000 NaCN-Ringer.				
		32	59	0,5	0,24	
		32	66	0,35	0,31	
		m/2000 NaCN-Ringer + Coffein natr. salicyl. 1:500 000.				
		54	74	0,8	0,30	
		56	21	1,2	0,29	Zucker —
78	17. II.	25	55	0,18	0,13	Versuch mit Cyan
		21	57	0,47	0,12	
		m/2000 NaCN-Ringer.				
		25	56	0,73	0,17	
		32	50	0,73	0,24	
		m/2000 NaCN — Coff. natr. salicyl. 1:500 000.				
		27	38	0,83	0,27	
		55	65	0,83	0,27	Zucker ±

1. Coffein.

Die Nierenwirkung von Coffein in geringer, die Froschniere nicht schädigender Konzentration (1 : 500000) ist von *Schmidt* (6) sichergestellt worden und wird von *Hartwig* (7) kürzlich bestätigt. Die früheren Versuche von *Cullis* (1) sind wegen der zu starken Coffeinkonzentration (0,1 Proz.), die die Gewebe irreversibel schädigt, unbrauchbar *Rowntree* und *Geraghty* (3),

die eine Coffeinlösung unbekannter Stärke durch die Nierenpfortader leisteten, beobachteten eine Steigerung der Harnmenge. *Barcroft* (15) fand eine Steigerung des Gaswechsels der Froschniere bei Durchströmung mit einer Coffeinlösung von der Pfortader aus.

In unseren Versuchen, die in Tabelle II angeführt sind, findet sich an der normalen, mit Sauerstoff versorgten Niere immer eine Steigerung der Harnmenge, wie bei *Schmidt* und *Hartwig*, und ein Anstieg der Chlorkonzentration des Sekrets, während die Zuckerundurchlässigkeit fast vollkommen erhalten geblieben ist. Die Gefäßreaktion der Nierengefäße ist in unseren Versuchen nicht eindeutig.

Bei der anoxybiotischen Niere ist ebenfalls eine Steigerung der Harnmenge zu beobachten, während die durch den Sauerstoffmangel an sich schon erhöhte Chlorkonzentration des Harns keine weitere Steigerung mehr erfährt. Die Reaktion der Nierengefäße ist verschieden.

Die cyanvergiftete Niere zeigt dasselbe Verhalten wie in Anoxybiose.

Sucht man die Resultate in dem einleitend ausgeführten Sinne zu deuten, so stellt die Beobachtung, daß die Diurese sowohl bei der normalen wie bei der sauerstoffarmen und cyanvergifteten Niere eintritt, sicher, daß für die Coffeindiurese die Tubuluszellen nicht notwendig sind, und daß diese Diurese also auf eine vermehrte Durchlässigkeit der Glomeruli zurückzuführen ist, denn es konnte keine einheitliche Gefäßwirkung beobachtet werden. Diese Feststellung schließt aber eine außerdem vorhandene Wirkung auf die Tubuluszellen nicht aus. Die an der normalen, mit Sauerstoff versorgten Niere beobachtete Abnahme der Verdünnungstätigkeit deutet vielmehr darauf hin, daß es noch außerdem zu einer Herabsetzung der Chlorresorption kommt, die wohl von einer verminderten Wasserresorption begleitet ist.

2. *Sublimat.*

Sublimat bewirkt schon in sehr geringen Konzentrationen in der Froschniere eine Diurese. [*R. Schmidt* (6) und *Hartwig* (7).] Dasselbe zeigen die folgenden Versuche der Tabelle III.

Mit der nach Sublimat 1 : 20 Millionen bis 1 : 20 Milliarden eintretenden Diurese steigt der Chlorgehalt des Nierensekrets an, während von den Gefäßen nur die Nierenpfortader eine Erweiterung aufweist. Dabei bleibt die Niere zuckerdicht.

Bei der anoxybiotischen Niere ist das Ausmaß der durch Sublimat hervorgerufenen Diurese wesentlich geringer, der an sich schon hohe Chlorgehalt des Harns steigt nicht weiter an, und Zucker tritt nicht oder nur in Spuren auf. Eine deutliche Gefäßreaktion fehlt.

Unter dem Einfluß von Blausäure ändert sich dagegen die Reaktion der Niere auf Sublimat vollständig. Von fünf einwandfreien Versuchen stellte sich nur einmal eine geringe Steigerung der Harnmenge, sonst immer eine deutliche Verminderung ein, die regelmäßig mit einer

Tabelle III.

Sublimatversuche.

Versuch	Datum 1925	Arterie ccm/h	Pfortader ccm/h	Harnmenge ccm/h	Cl-Konzentration Proz.	Bemerkungen
95	4. III.	13	18	0,33	0,06	Versuch mit Sauerstoff
		18	26	0,30	0,09	
			Sublimat 1:1 Milliarde.			
		27	31	0,67	0,11	
		25	26,5	0,77	0,19	Zucker —
102	12. III.	24	29	0,50	0,19	Versuch mit Anoxybiose
		27	46	0,91	0,40	
			Sublimat 1:2 Milliarden.			
		25	48	0,87	0,39	
		21	36	0,57	0,39	Zucker —
107	17. III.	25	88	0,60	0,36	Versuch mit Anoxybiose
		18	73	0,65	0,33	
			Sublimat 1:1 Milliarde.			
		20	94	0,73	0,35	
		21	78	0,86	0,35	Zucker ±
89	24. II.	67	62	0,25	0,13	Versuch mit Cyan
			m/2000 NaCN-Ringer.			
		77	13	0,88	0,22	
		77	14	1,19	0,26	
			m/2000 NaCN-Ringer + Sublimat 1:100 Millionen.			
		55	21	1,90	0,26	
		33	19	1,34	0,26	
100	11. III.	25	18	0,18	0,04	Versuch mit Cyan
			m/1000 NaCN-Ringer, p_H 7,45.			
		42	45	0,70	0,15	
		58	81	1,12	0,15	
			m/1000 NaCN-Ringer + Sublimat 1:1 Milliarde.			
		38	48	0,72	0,16	

Gefäßverengung der Nierenarterien und in drei Versuchen auch der Nierenpfortader einhergeht. Der an sich schon hohe Chlorgehalt steigt nicht mehr, oder nur dort, wo er noch nicht die Höhe der Durchströmungsflüssigkeit erreicht hat.

Unter diesen Befunden ist zunächst die Herabsetzung der Harnmenge von der cyanvergifteten Niere auffallend, die wohl auf die Gefäßverengerung bezogen werden darf, obgleich zur Harnproduktion noch genügend Salzlösung durch beide Gefäßsysteme strömt.

Die Cyanversuche fallen also zur Analyse der Sublimatwirkung wegen der dabei auftretenden Gefäßkontraktionen aus, jedoch genügen zum Vergleich die Versuche an der sauerstoffarmen und mit Sauerstoff

versorgten Niere. Eine Entscheidung, ob an der normalen Niere die Sublimatdiurese auf eine gesteigerte Durchlässigkeit der Glomeruli oder verminderte Rückresorption der Tubuli zurückzuführen ist, geben die Versuche mit Anoxybiose, in denen nach Ausschaltung der Tubuli das Glomerulusfiltrat nicht oder nur wenig zunimmt. Zudem spricht auch der Anstieg des Chlorgehalts bei der normalen Niere, sowie die Gefäßerweiterung im Nierenpfortadergebiet für eine schädigende Wirkung des Quecksilbers auf die Tubuli.

3. Harnstoff.

Die diuretische Wirkung des Harnstoffs ist für die Froschniere zuerst von *Cullis* (1) nachgewiesen worden. Wurden die Glomeruli nur von der Arterie mit einer 0,2- bis 0,4proz. Harnstofflösung durchströmt, so erfolgte Diurese, wurden nur die Tubuli durchströmt, während durch die Glomeruli Ringerlösung floß, so blieb die Harnmenge unverändert. Weiter haben dann *Schmidt* (6) und *Hartwig* (7) eine Steigerung der Diurese festgestellt, wenn die ganze Niere mit Harnstofflösung 1 : 200 bis 1 : 500 durchströmt wurde.

Dasselbe zeigen unsere Versuche in Tabelle IV.

Bei der normalen, mit Sauerstoff versorgten Niere tritt auf Harnstoff eine Diurese ein, aber nicht immer prompt; es bedarf öfter einer gewissen Zeit, die von der Durchströmung des toten Raumes in den Kanülen von der Umschaltestelle bis zur Niere unabhängig ist. Mit der Harnmenge steigt der Chlorgehalt des Harns an. Die Niere bleibt zuckerdicht. Die Gefäße der Nierenarterie und Pfortader zeigen keine einheitliche Reaktion.

Sauerstoffmangel und Blausäure beeinflussen nun stark die Harnstoffwirkung. Es kommt in drei von insgesamt elf Versuchen zu keiner Wirkung, oder in sechs Versuchen zu einer Diuresehemmung, die in acht Versuchen von einer Verengerung einer oder beider Gefäßgebiete begleitet ist. Diese eigentümliche Reaktion erinnert an ein ähnliches Verhalten, das *Horiuchi* (16) an der durchströmten Warmblüterniere beobachtet hat. Wurde Harnstoff mit Tyrodelösung durch die Warmblüterniere geleitet, so verengten sich die Nierengefäße, wurde dagegen der Niere mit defibriniertem Blute Sauerstoff und Harnstoff zugeführt, so erweiterten sich die Nierengefäße. Diese Gefäßkontraktion und Diuresehemmung an der Froschniere machte für uns die beabsichtigte Analyse zunichte. Ergänzend stehen aber die Versuche von *Cullis* (1) zur Verfügung, die auf eine Glomeruluswirkung des Harnstoffs hinweisen.

Fassen wir die Ergebnisse zusammen, so bestätigen sie zunächst die Befunde von *David* und *Hoeber*, daß durch Sauerstoffmangel oder Blausäure die Froschniere ihr Sekret nicht mehr verdünnt und nach unseren Versuchen eine größere Harnmenge abscheidet. Daß diese

Tabelle IV.

Harnstoffversuche.

Versuch	Datum 1925	Arterie ccm/h	Pfortader ccm/h	Harnmenge ccm/h	Cl-Konzentration Proz.	Bemerkungen
69	7. II.	45	59	0,4	0,08	Versuch mit Sauerstoff
		27	27	0,15	0,09	
		44	59	0,25	0,09	
		40	30	0,45	0,08	
		Harnstoff = Ringer 1:200.				
		55	52	0,7	0,12	
		55	57	0,6	0,10	Zucker —
109	18. III.	61	84	0,93	0,39	Versuch mit Anoxybiose
		44	92	1,18	0,39	
		46	77	0,60	0,40	
		34	62	0,86	0,40	
		Harnstoff = Ringer 1:200.				
		32	49	0,68	0,45	
		31	41	0,55	0,41	Zucker ±
112	20. III.	46	16	0,42	0,36	Versuch mit Anoxybiose
		29	12	0,48	0,35	
		31	24	0,62	0,43	
		36	18	0,66	0,39	
		Sublimat 1:2 Millarden.				
		29	15	0,53	0,40	
		33	19	0,25	0,38	
52	9. I.	48	46	0,13	0,28	Versuch mit Cyan
		m/2000 NaCN-Ringer.				
		56	62	0,4	0,29	
		NaCN-Ringer + Harnstoff 1:500.				
		57	60	0,9	0,30	
		57	58	1,3	0,31	
65	5. II.	54	39	0,5	0,07	Versuch mit Cyan
		52	63	0,7	0,07	
		m/2000 NaCN-Ringer.				
		78	50	1,15	0,08	
		78	28	1,20	0,13	
		m/2000 NaCN-Ringer + Harnstoff 1:500.				
		63	46	0,75	0,12	
		51	28	0,70	0,13	Zucker —
62	30. I.	22	40	0,5	0,07	Versuch mit Cyan
		20	18	0,4	0,08	
		m/2000 NaCN-Harnstoff.				
		34	53	1,2	0,12	
		44	88	1,5	0,17	
		m/2000 NaCN-Harnstoff + 1:500.				
		36	36	1,5	0,19	
		23	32	1,5	0,22	Zucker —

Wirkung auf eine Herabsetzung der Salze und Wasser resorbierenden Tubuluszellen zurückzuführen ist, darf nach den Versuchen von *Richards* als richtig angesehen werden. Untersucht man an diesen nur noch ein Glomerulusfiltrat absonderer Nieren, die Wirkung von Coffein, Sublimat und Harnstoff, so findet sich die diuretische Wirkung von Coffein erhalten. Die Zunahme des „Glomerulusfiltrats" macht also eine Wirkung des Coffeins auf den Glomerulus wahrscheinlich. Daraus, daß Sublimat nur in geringem Maße oder gar nicht den Harn der anoxybiotischen Niere steigert, wird eine Wirkung auf die Glomeruli ausgeschlossen und eine die Resorption der Tubuluszellen herabsetzende Wirkung wahrscheinlich. Auf Harnstoff verengern sich die Gefäße der Nierenarterie und Nierenpfortader; die dadurch hervorgerufene Herabsetzung der Diurese vereitelt die beabsichtigte Analyse.

Literatur.

1) *Cullis*, Journ. of Physiol. **84**, 250, 1906; **87**, 16, 1908. — 2) *Bainbridge*, *Menzie* und *Collins*, Proc. Roy. Soc. B. **86**, 355, 1913; Journ. of Physiol. **48**, 233, 1914. — 3) *Rowntree* und *Geragthy*, zitiert nach *Cushny* (5). — 4) *Halsey*, Proc. am. Physiol. Soc. 1901; Amer. Journ. of Physiol. **6**, 16, 1902. — 5) *Cushny*, The secretion of urine, London 1917, S. 74 bis 83. — 6) *Robert Schmidt*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **95**, 267, 1922. — 7) *Hartwig*, ebendaselbst **111**, 81, 1926; **117**, 206, 1926. — 8) *Starling* und *Verney*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **205**, 47, 1924. — 9) *Yoshida*, ebendaselbst **206**, 274, 1924. — 10) *David*, ebendaselbst **206**, 294, 1924; **208**, 146, 1925; **208**, 529, 1925; — 11) *Schulten*, ebendaselbst **208**, 1, 1925. — 12) *Deutsch*, ebendaselbst **208**, 177, 1925. — 13) *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. **74**, 1 und 37, 1925. — 14) *Ruszniak*, diese Zeitschr. **114**, 23, 1921. — 15) *Barcroft*, Ergebn. d. Physiol. **7**, 744, 1908. — 16) *Horiuchi*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **206**, 473, 1924. — 17) *Richards*, Amer. Journ. of Physiol. **59**, 144, 184, 489, 1922.

Versuche über die Empfindlichkeit der Blutgefäße des Frosches gegen Adrenalin.

Von

Yoshimori Okuyama[1]).

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 21. Mai 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Bei der Bearbeitung der die inneren Sekrete betreffenden Fragen sind Methoden der quantitativen Messung der inneren Sekrete von hoher Empfindlichkeit erwünscht. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche gingen von der Hoffnung aus, die Empfindlichkeit des Froschgefäßpräparats experimentell auf eine solche Höhe zu treiben, daß dies Präparat zum Nachweis kleinster Adrenalinmengen brauchbarer würde als es bisher ist.

Bisher wirkt auf die Sicherheit der Auswertungen störend ein, daß die spontane Empfindlichkeitssteigerung, die im Laufe der Zeit bekanntlich bei diesem Präparat zu beobachten ist, sehr großen individuellen Schwankungen unterliegt, und daß man nur selten Präparate von höchster Empfindlichkeit erhält.

Auf die verschiedenen Arbeiten, die sich mit der Frage der spontanen Empfindlichkeitssteigerung des Froschgefäßpräparats beziehen, sei bei den einzelnen Abschnitten dieser Arbeit hingewiesen. Hier sei nur betont, daß ein für das Ansteigen der Empfindlichkeit besonders wichtiger Faktor unlängst von *Stuber*, *Russmann* und *Proebsting*[2]) sichergestellt wurde: Die Einwirkung von Adrenalin macht das Präparat überempfindlich gegen eine nachfolgende Adrenalingabe. Inzwischen hat *Nikolaeff*[3]) unter *Anitschkoff* in ganz eindeutig verlaufenden Ver-

---

[1]) Dr. *Okuyama* mußte wegen schwerer Erkrankung vorzeitig die Rückreise in seine Heimat antreten. Er sollte die Heimat nicht wiedersehen; auf der Reise erlag er seinem Leiden, von allen, die den strebsamen Forscher kennengelernt haben, aufrichtig bedauert.

[2]) *B. Stuber*, *A. Russmann* und *E. A. Proebsting*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 396, 1923.

[3]) *M. P. Nikolaeff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **48**, 310, 1926.

suchen am Kaninchenohrpräparat gezeigt, daß wiederholte Adrenalineinwirkungen eine mehr und mehr zunehmende Steigerung der Adrenalinempfindlichkeit herbeiführt. Die gleiche Erfahrung hatte übrigens auch *Bröking* in seiner gemeinsam mit *Trendelenburg*[1]) durchgeführten Arbeit gemacht (er publizierte sie aber nicht). Um zu möglichst hoher Adrenalinempfindlichkeit zu gelangen, pflegte er zunächst eine hohe Adrenalingabe, die das Präparat lange Zeit zu maximaler Verengerung erregte, einzuspritzen. Auf die Frage, ob das Adrenalin selbst oder die aus ihm entstehenden Zerfallsprodukte, wie *Stuber* und Mitarbeiter annehmen, die Sensibilisierung herbeiführen [s. hierzu auch *Hülse*[2])], sei hier nicht näher eingegangen.

Nach den Erfahrungen dieses Instituts scheint aber diese Sensibilisierung der Gefäße gegen Adrenalin durch Adrenalin nicht der einzige Weg zu sein, um zu vermehrter Adrenalinempfindlichkeit zu gelangen. Auch das ohne Adrenalineinwirkungen belassene Präparat erweist sich nach länger anhaltender Ringerdurchströmung weit adrenalinempfindlicher, als die Präparate sie im Beginn der Ringerdurchströmung zu besitzen pflegen.

Alle meine Versuche habe ich an Rana esculenta ausgeführt.

1. Einfluß der Entnervung auf die Adrenalinempfindlichkeit der Froschgefäße.

Die Tatsache, daß die Durchtrennung des Ischiadicus nach einiger Zeit die Blutgefäße der Esculenten stärker auf Adrenalin reagieren macht, ist seit *Pearces* Untersuchungen[3]) bekannt. Er gibt an, daß längere Zeit nach der Durchtrennung die Gefäßpräparate eine sehr hohe Adrenalinempfindlichkeit zeigen können.

Am Ohrgefäßpräparat des Kaninchens konnte kürzlich *Shimidzu*[4]) nachweisen, daß die Anfangsempfindlichkeit der Gefäße eines Ohres, dessen postganglionäre Bahnen seit 3 bis 12 Tagen ausgeschaltet worden waren, bis achtmal so groß ist, wie die des normal innervierten Ohres der anderen Seite.

Ich habe bei Fröschen den Nervus ischiadicus einseitig durchschnitten oder die Bauchganglienkette einseitig entfernt und nach wenigen Tagen bis zu 7 Wochen nachgesehen, wie sich die Adrenalinempfindlichkeit auf der entnervten und der normalen Seite verhielt. Dabei wurden beide Beine von der gleichen Vorratsflasche aus gemeinsam durchströmt, aber der Abfluß aus beiden Venen getrennt aufgefangen.

Ich fand, daß erst nach 1 Woche das entnervte Bein einigermaßen regelmäßig stärker reagierte als das normale Bein, wenn in die sie durchströmende Ringerlösung 0,3 ccm geeignet verdünnter Adrenalinlösung eingespritzt wurde. Eine Woche nach der Durchtrennung des Ischiadicus

[1]) *E. Bröking* und *P. Trendelenburg*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **103**, 168, 1911.

[2]) *W. Hülse*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 240, 1922.

[3]) *R. G. Pearce*, Zeitschr. f. Biol. **62**, 243, 1913

[4]) *K Shimidzu*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **104**, 254, 1924.

fand sich in fünf von elf Versuchen ein starker Unterschied zugunsten des entnervten Beines, in den übrigen sechs Versuchen kein sicherer Unterschied; war eine Woche zuvor die sympathische Ganglienkette entfernt worden, so lagen die Dinge ebenso: zweimal von fünf Versuchen starke Empfindlichkeitssteigerung, dreimal kein sicherer Unterschied.

Wenn seit der Entnervung oder seit der Entfernung des sympathischen Grenzstranges 2, 3 oder 4 Wochen zurücklagen, so war ausnahmslos (zehn Versuche) das entnervte Bein erheblich empfindlicher als das Normalbein (Abb. 1). In vergleichenden Versuchen stellte ich fest, daß etwa gleich

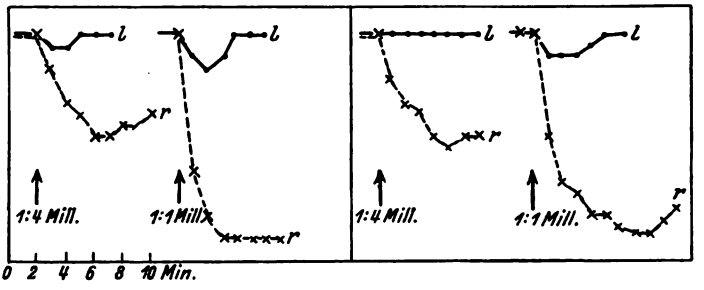


Abb. 1.

Steigerung der Adrenalinempfindlichkeit am Froschbein nach Durchtrennung des gleichseitigen Ischiadikus (linke Kurven) bzw. nach Entfernung des Grenzstranges (rechte Kurven). — Das rechte Bein liegt auf der Seite der Operation.

starke Gefäßverengerungen zustande kommen, wenn vier- bis achtmal kleinere Adrenalinmengen auf das entnervte Bein einwirkten.

Die höhere Empfindlichkeit ist also nach Entnervung regelmäßig vorhanden. Aber die Erhöhung hält sich in mäßigen Grenzen, und es ist ausgeschlossen, daß die große spontane Empfindlichkeitssteigerung, die ein normales Froschpräparat im Laufe der Durchströmung zeigen kann, etwa einfach die Folge davon ist, daß sich postmortal analoge Veränderungen an der Gefäßmuskulatur abspielen, wie sie im Leben nach der Nervendurchtrennung zu sehen sind. In diesem Ergebnis stimmen meine Versuche mit den Angaben *Shimidzus* überein, der am Kaninchenohrpräparat analoge Versuche machte. Auch habe ich mich davon überzeugt, daß die spontane Empfindlichkeitssteigerung während der Durchströmung gegen Adrenalin am entnervten Froschbein keineswegs fehlt, sondern daß auch hier die Verhältnisse so liegen, wie sie *Shimidzu* am Ohrpräparat fand.

Für die Praxis der Adrenalinauswertungen am Froschgefäßpräparat ergibt sich also, daß das Arbeiten am entnervten Bein keine sehr wesentlichen Vorzüge hat.

2. Einfluß der Kationen der Ringerlösung auf die Adrenalinempfindlichkeit der Blutgefäße.

Über die Abhängigkeit der Adrenalinempfindlichkeit von den Kationen der die Gefäße durchspülenden Salzlösung liegen mehrere Angaben vor, die sich aber zum Teil widersprechen. Die Höhe des Ca-Gehalts ist nach

Schmidt[1]) und *Hülse*[2]) von Bedeutung. Nach *Schmidt* wirkt die einmalige Injektion von 0,01 Proz. $CaCl_2$ hemmend auf die Adrenalinempfindlichkeit des Froschgefäßpräparats, und ebenso wird die Adrenalinwirkung abgeschwächt, wenn das Präparat dauernd mit einer zehnfachen Ca-Gehalt aufweisenden Ringerlösung durchströmt wird. *Hülse* machte ähnliche Beobachtungen wie *Schmidt*. Dagegen beobachtete *Alday-Redonnet*[3]) bei einem Plus von 0,2 Proz. $CaCl_2$ in bicarbonatfreier Lösung eine Empfindlichkeitszunahme. Schließlich gibt *Leites*[4]) an, daß am Kaninchenohre Adrenalin bei einer Durchströmung mit 0,8 statt mit 0,2 Proz. $CaCl_2$ stärker wirke.

In meinen Versuchen wurde der Ca-Gehalt der durch das eine Bein strömenden Salzlösung auf das Zwei-, Vier- und Achtfache der durch das andere Bein strömenden Normalringerlösung gebracht. Die Adrenalinempfindlichkeit und deren Zunahme war auf beiden Seiten nahezu die gleiche, nur bei achtfacher Ca-Konzentration wirkte Adrenalin etwas schwächer.

Bei völligem Ca-Mangel ist nach *Schmidt* das Froschpräparat besonders adrenalinempfindlich, während *Medici*[5]) am Froschpräparat und *Leites* am Kaninchenohr nur eine Abnahme der Adrenalinwirkungen feststellte. *Stuber* und Mitarbeiter sowie *Hülse* weisen darauf hin, daß citrathaltige, also an Ca-Ionen arme Ringerlösung zu hohen Adrenalinempfindlichkeiten führt.

Ich reduzierte den Ca-Gehalt der das eine Bein durchströmenden Lösung auf ½, ¼ und $^1/_8$ und fand keine eindeutigen und ausgesprochenen Unterschiede in der Adrenalinempfindlichkeit dieses Beines im Vergleich zum anderen mit Normalringer durchströmten Bein.

Von ähnlich untergeordneter Bedeutung erwies sich die Menge der K-Ionen, wie auch *Leites* angibt.

Schmidt sah nach K-Vermehrung eine Abschwächung oder Umkehr der Adrenalineinwirkung, bei K-Mangel eine Steigerung. Nach *Alday-Redonnet* bewirkt dagegen eine Vermehrung der KCl-Menge auf 1 Prom. eine hervorragende Sensibilisierung gegen Adrenalin, *Hülse* gibt an, daß eine 0,05 oder 0,1 Proz. KCl enthaltende 0,7proz. NaCl-Lösung zu besserer Adrenalinempfindlichkeit führt, als die reine NaCl-Lösung.

Ich steigerte den K-Gehalt der Ringerlösung auf das Zwei-, Vier- und Achtfache, verminderte ihn andererseits auf ½, ¼ und $^1/_8$ und fand, daß diese Änderung der Ringerlösung, die wieder nur das eine Bein betraf, während das andere mit Normalringer gespeist wurde, ohne sicheren Einfluß auf Adrenalinanfangsempfindlichkeit und auf die Zunahme der Adrenalinempfindlichkeit war.

8. Über den Einfluß der Reaktion auf die Adrenalinempfindlichkeit

wird übereinstimmend berichtet, daß das Fortlassen des Bicarbonats aus der Ringerlösung zu einem raschen Verlust der Anspruchsfähigkeit des Froschpräparats auf Adrenalin führt, und daß das Optimum der Adrenalin-

---

[1]) *A. K. Schmidt*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **89**, 144, 1921.
[2]) *W. Hülse*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **80**, 240, 1922.
[3]) *Th. Alday-Redonnet*, diese Zeitschr **110**, 306, 1920.
[4]) *S. Leites*, Zeitschr. f d. ges. exper. Med. **44**, 319, 1925.
[5]) *G. Medici*, diese Zeitschr. **151**, 133, 1924.

wirksamkeit bei etwa p_H 8 bis 9 gelegen ist [*Schmidt, Hülse, Alday-Redonnet, Leites, Alpern*[1]), *Medici*].

Alday-Redonnet weist darauf hin, daß bei dauernder Durchströmung des Froschpräparats mit bicarbonathaltiger (normaler) Ringerlösung die Reaktion der abfließenden Lösung, die anfangs auf der sauren Seite liegt, sich mehr und mehr nach der alkalischen Seite hin verschiebt, und er vermutet, daß die zunehmende Alkalisierung des Präparats in ursächlicher Beziehung zur spontanen Zunahme der Adrenalinempfindlichkeit der Präparate im Verlaufe der Durchspülung stehe.

Ich erwartete deshalb, daß bei der Durchströmung des einen Froschbeins mit einer Ringerlösung, bei der das $NaHCO_3$ durch Na_2CO_3 ersetzt wurde, wodurch also die Bedingungen zu rascher Alkalisierung des Präparats verbessert wurden, die Gefäße dieses Beines eine höhere Anfangsempfindlichkeit und besonders eine raschere Zunahme der Empfindlichkeitssteigerung zeigen würden.

Unter vier Versuchen reagierte das mit sodahaltiger Ringerlösung durchspülte Bein aber nur zweimal im Beginn wesentlich stärker als das andere mit bicarbonathaltiger Ringerlösung gespeiste Bein, während in den beiden anderen Versuchen kein erheblicher Unterschied zu erkennen war. In allen vier Versuchen war der einige Stunden lang verfolgte Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit auf beiden Seiten fast der gleiche und auf der Sodaseite nicht begünstigt.

So wird durch meine Versuche die Theorie von *Alday-Redonnet* nicht gestützt, und es erscheint mir ausgeschlossen, daß das Maß der Alkalisierung des Präparats allein bestimmend sein könnte für die Spontansensibilisierung der Präparate.

4. Einfluß des Serums auf die Adrenalinempfindlichkeit.

Die bisher beschriebenen Versuche, die ich anstellte, haben also keine Anhaltspunkte dafür gegeben, daß den anorganischen Bestandteilen der Durchströmungsflüssigkeit eine ausschlaggebende Bedeutung bei dem Zustandekommen des Phänomens der Spontansensibilisierung zukommt. Ich wandte mich deshalb dem Studium der Bedeutung der organischen Bestandteile der Gewebe und des Blutes zu. A priori ist anzunehmen, daß die dauernde Durchströmung der Blutgefäße mit *Ringer*scher Lösung den kolloidalen Zustand der Eiweißkörper, Lipoide und anderer kolloidaler, in dem Gefäßmuskel enthaltener Substanzen verändert. Es war denkbar, daß mit einer durch die Kolloidfreiheit der Lösung bedingten Zunahme der Labilität der Gewebskolloide die Sensibilisierung zusammenhinge.

Eine solche Störung der kolloidalen Struktur der Gefäßmuskulatur muß ausbleiben oder doch geringer sein, wenn man das Gefäßsystem mit unverändertem arteigenen Blutserum durchströmt. Ein solcher Versuch stößt aber nicht nur deshalb auf große Schwierigkeiten, weil es nicht möglich ist, genügende Mengen Froschserums zu gewinnen, sondern es stellt sich ihm die weitere Schwierigkeit entgegen, daß das arteigene Serum auf die Blutgefäße stark verengernd wirkt.

Ich verwandte zur Durchströmung des einen Beines vorwiegend Pferdeserum, von dem bekannt ist, daß es eine relativ sehr geringe gefäßverengernde Wirksamkeit auf die Froschgefäße entfaltet. Das Serum wurde

---

[1]) *D. Alpern*, Arch. f. d. ges. Physiol. **205**, 578, 1924.

in wechselndem Verhältnis mit Ringerlösung verdünnt, nachdem es durch Zusatz von 30 ccm Wasser zu 100 ccm froschisoton gemacht worden war. Durch das andere Bein wurde serumfreie Ringerlösung geleitet.

Bei dieser Anordnung traten zwei Tatsachen in Erscheinung. Einmal wirkt Adrenalin im Beginn des Versuchs in der Regel auf der Serumseite — die Ringerlösung enthielt hier 20 Proz. Serum — erheblich schwächer, und zweitens ist die Empfindlichkeitszunahme auf der Serumseite eine geringere als auf der Ringerseite. Aber es gelingt keineswegs, die Empfindlichkeitszunahme durch die dauernde Serum-Ringerdurchspülung zu verhindern, und beim Umstellen der seit längerer Zeit durch das eine Bein fließenden reinen Ringerlösung auf Serumringer ist höchstens nur eine unbedeutende Abnahme der in die Höhe gestiegenen Sensibilität zu finden.

Bei diesen Versuchen machte ich eine eigenartige Beobachtung. Wenn nämlich die zu injizierende Adrenalinlösung nicht in Ringerlösung gelöst eingespritzt wurde, sondern die Adrenalinverdünnung mit destilliertem Wasser bereitet wurde, so traten die Unterschiede auf beiden Seiten viel stärker in Erscheinung. Ich habe 17 derartige Versuche mit Serumverdünnungen 1 : 10 bis 1 : 1200 angestellt. In keinem Versuch zeigte das Serumbein die stärkere Empfindlichkeit oder raschere Empfindlichkeitszunahme, nur in vier Versuchen war eine sichere Verstärkung der Reaktion des Serumbeines zu sehen, in den übrigen 13 Versuchen reagierte das Serumbein viel schwächer auf die Adrenalinjektionen als das Ringerbein, auch war die Empfindlichkeitszunahme des ersteren meist die stärkere (Abb. 2). Diesen Befund hatte ich auch bei je einem Versuch mit Katzen-, Kaninchen-, Froschserum 1 : 1000 (diese Versuche sind in den oben genannten Zahlen enthalten).

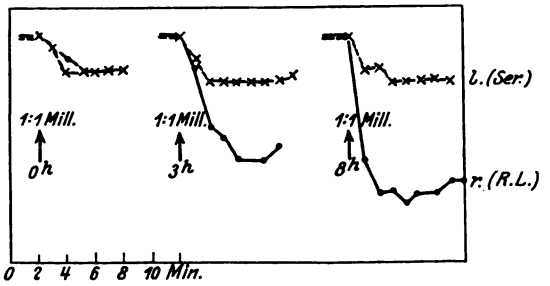


Abb. 2.
Der Zusatz von Pferdeserum 1 : 40 zur Ringerlösung verringert den Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit. Das Kontrollbein (rechtes Bein) wird mit Ringerlösung durchströmt. (Adrenalin in diesem Versuch in dest. Wasser eingespritzt.)

Warum die Differenz zwischen Serum- und Ringerbein so viel deutlicher in Erscheinung tritt, wenn das Adrenalin in destilliertem Wasser gelöst gegeben wird, als wenn es in der Durchspülungsflüssigkeit injiziert wird, vermag ich nicht zu sagen. Am Normalpräparat wirkt übrigens Adrenalin in destilliertes Wasser eingespritzt erheblich schwächer, wie die gleich starke Lösung in Ringer.

Die Versuche lassen meines Erachtens den Schluß zu, daß die Durchströmung der Gefäße mit Serum-Ringer die Empfindlichkeit gegen Adrenalinreiz und besonders gegen den Reiz Adrenalin + destilliertes Wasser abzuschwächen

die Tendenz hat, und daß die Empfindlichkeitszunahme bei solcher Durchströmung vermindert ist. Diese Verminderung ist aber keine so starke, daß man sagen könnte: der Mangel der Serumkolloide in der Ringerlösung ist die Ursache der spontanen Sensibilitätssteigerung.

Mit der Frage über den Einfluß von Blutplasma oder Serum auf die Adrenalinempfindlichkeit haben sich hauptsächlich *Moog*[1]) sowie *Stuber*, *Russmann* und *Proebsting* beschäftigt.

Moogs Angaben decken sich nicht mit unseren Befunden. Nach *Moog* soll abgestandenes Serum (des Menschen) auch bei starker Verdünnung mit Ringerlösung (1 : 150 z. B.) die Wirkung eingespritzten Adrenalins verstärken; die Serumverdünnung wurde in diesen an Eskulenten ausgeführten Versuchen längere Zeit hindurch eingeleitet. Citratplasma hingegen ließ in den Verdünnungen 1 : 25 bis 1 : 150 diese sensibilisierende Wirkung vermissen.

Nach *Stuber*, *Proebsting* und *Russmann* hat aber gerade das eine Zeitlang gestandene Citratblut eine besonders starke sensibilisierende Wirkung, während altes Serum und altes Plasma keine so sichere wirksamkeitssteigernde Wirkung entfalteten. Diese Feststellungen beziehen sich auf Versuche, in denen das Serum usw. teils dauernd durchströmt wurde, teils einmal oder mehrere Male injiziert worden war. Ich selbst habe keine Versuche mit Citratblut- oder Plasma vorgenommen.

Nachdem so festgestellt worden war, daß der Zusatz von Serum zur Durchströmungsflüssigkeit den Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit zu verlangsamen pflegt, habe ich durch acht Versuche zu entscheiden versucht, ob diese hemmende Wirkung durch dialysable oder adialysable Bestandteile des Serums bedingt ist. Serum wurde 24 Stunden lang gegen eine verhältnismäßig geringe Menge physiologischer Kochsalzlösung dialysiert. Das Dialysat wurde unverdünnt oder 1 : 2, 1 : 10, 1 : 15 und 1 : 20 mit Ringerlösung verdünnt durch das eine Bein geleitet, während das andere Bein normale Ringerlösung erhielt. In keinem der Versuche war der Unterschied so ausgesprochen, wie bei den Serumversuchen. Nur zweimal fand ich eine geringere Zunahme der Empfindlichkeit auf der Seite, die den Dialysenінhalt erhielt, in den übrigen Versuchen war überhaupt kein sicherer Einfluß zu sehen. Die die Empfindlichkeit und die Spontansensibilisierung hemmenden Serumbestandteile scheinen also schlecht dialysabel zu sein.

Daß der Eiweißgehalt des Serums an sich die Hemmung der Spontansensibilisierung bewirkt, scheint mir nach acht Versuchen mit Casein unwahrscheinlich. Casein wurde zu 1 Proz in Ringerlösung aufgelöst. Nur in einem Versuch war die Adrenalinwirksamkeit auf der Casein-Ringerseite eine erheblich geringere, in den übrigen Fällen fehlte ein eindeutiger Unterschied.

5. Einfluß der Lipoide auf die Adrenalinempfindlichkeit.

Vom überlebenden Froschherzen ist seit *Clarks* Untersuchungen bekannt, daß die dauernde Speisung mit *Ringer*scher Lösung sehr bald einen Zustand der Hypodynamie erzeugt, der durch die Entziehung der Lipoide bedingt ist. Der Zusatz der Serumlipoide zur Ringerlösung hebt den hypodynamen Zustand wieder auf.

Es erschien mir möglich, daß auch die Erscheinung der spontanen Sensibilisierung der Gefäßpräparate mit einer Lipoidverarmung zusammen-

[1]) *O. Moog*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 77, 346, 1914.

hängen könne. Deshalb wurden einige weitere Versuchsreihen durchgeführt, in der das eine Bein mit lipoidhaltiger Ringerlösung, mit cholesterin- oder lecithinhaltiger Lösung durchströmt wurden, während das andere Bein normale Ringerlösung erhielt. Beide Gefäßbahnen erhielten dann in der üblichen Weise alle Stunde je eine überschwellige Adrenalindosis und es wurde nachgesehen, ob der Lipoid-, Cholesterin- oder Lecithingehalt von Einfluß auf Anfangsempfindlichkeit und Empfindlichkeitszunahme war.

Durch Soxlethextraktion von Serumpulver wurden die Lipoide gewonnen. Von der eingeengten ätherischen Lösung wurde so viel zugegeben, daß 100 ccm Ringerlösung die in 5 bis 10 ccm Serum enthaltenen Lipoide erhielt. Der Kontrollringerlösung, die das zweite Bein durchströmte, wurden gleiche Äthermengen zugegeben, so daß beide Beine mit 0,5 Proz. Äther in Ringer durchströmt wurden.

Ähnlich wie bei den oben erwähnten Durchströmungen mit Serumverdünnungen, hatten die Lipoiddurchströmungen den Einfluß, daß der Ausschlag einer Adrenalineinwirkung bald gegenüber dem am Normalbein beobachteten Ausschlag zurückblieb, d. h. die Empfindlichkeitssteigerung war eine geringere, blieb aber nicht völlig aus. (Abb. 3). Auch bei diesen

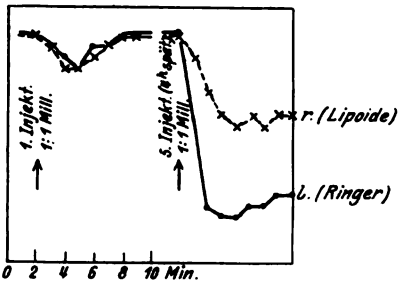


Abb. 3.

Der Zusatz von Serumlipoiden zur Ringerlösung vermindert den Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit (rechtes Bein: Serumlipoidringerlösung, linkes Bein: Ringerlösung).

Lipoidversuchen machte ich die Beobachtung, daß der Unterschied auf beiden Seiten immer (in neun Versuchen) viel stärker ausgeprägt war, wenn das Adrenalin nicht in der Durchströmungsflüssigkeit, sondern in destilliertem Wasser gelöst injiziert wurde.

Die Sättigung der Ringerlösung mit *Cholesterin* hemmte den Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit nicht so sicher, wie die Sättigung mit Lipoiden. Nur in der Hälfte der sehr zahlreichen Versuche, in denen das eine Bein mit Cholesterinringer durchströmt wurde (0,5 ccm ätherischer Cholesterinlösung wurde in 100 ccm Ringer gegeben, nach Umschütteln wurde filtriert; das andere Bein wurde mit 0,5 Proz. Äther-Ringer durchspült), verlangsamte der Cholesterinzusatz den Empfindlichkeitsanstieg.

Ganz ähnlich waren die Ergebnisse mit Lecithin-Ringer. Oft war der Anstieg der Adrenalinempfindlichkeit abgeschwächt, aber in keinem Falle war er aufgehoben.

So sind Lipoide zwar zweifellos von Einfluß auf die Sensibilisierung der Blutgefäße des Frosches, aber die Erscheinung der Spontansensibilisierung ist nicht nur die Folge einer Lipoidentziehung.

Zusammenfassung.

Es wurden die Faktoren, die die spontane Empfindlichkeitssteigerung der Froschblutgefäße gegen Adrenalin bestimmen, näher zu analysieren versucht.

Degeneration der Gefäßnerven durch zuvor ausgeführte Nervendurchtrennung macht die Blutgefäße des Frosches zwar wesentlich adrenalinempfindlicher, aber die im Verlauf einer längeren Durchströmung auftretende Spontansensibilisierung ist nicht beseitigt.

Im Gegensatz zu anderen Untersuchern erwies sich eine Änderung des Ca- und K-Gehalts der Ringerlösung nach oben und unten als wenig bedeutsam für die Adrenalinempfindlichkeit, und ebenso ließ sich die Empfindlichkeit durch Vermehrung der Alkaleszenz nicht sicher begünstigen. Dagegen wirken Zusatz von Serum und Serumlipoiden hemmend auf die Empfindlichkeitszunahme der Blutgefäße. Doch kann die Spontansensibilisierung nicht nur die Folge des Mangels von Eiweißkörpern und Lipoiden in der Ringerlösung sein, denn auch bei Serumdurchströmung steigt die Adrenalinempfindlichkeit, wenn auch verlangsamt an. Es gelang also nicht, das Wesen der Spontansensibilisierung restlos aufzuklären.

Versuche
über die Wirksamkeit der Nebenschilddrüsenauszüge des Handels.

Von

Marialuis Köhler.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 21. Mai 1926.)

Bekanntlich hatten die Versuche, die Tetanie im Tierversuch oder bei tetanischen Patienten durch Zufuhr von Nebenschilddrüsensubstanz oder von Nebenschilddrüsenauszügen zu heilen, bis vor kurzem vollkommen unsichere Ergebnisse Neben spärlichen Angaben über günstige Erfolge überwogen die Berichte über Mißerfolge. (Die Literatur ist in *Biedls* Innere Sekretion, 2. Aufl., angeführt.)

Längere Zeit, ehe *Collip* [1]) seine Mitteilung über die Gewinnung eines den Kalkstoffwechsel des Tetanischen und des Gesunden beeinflussenden Hormons aus den Epithelkörperchen machte und damit als erster sicherstellte, daß die Epithelkörperchen ein den Kalkstoffwechsel regulierendes Hormon enthalten, unternahm *Fetzer* [2]) in diesem Institut eine Reihe von Versuchen, die die Wirksamkeit der Substitutionstherapie auf die experimentelle Tetanie betrafen. Bei Katzen wurden die Epithelkörperchen samt Schilddrüsen entfernt und nach ausgebrochener Tetanie wurden Epithelkörperchen transplantiert oder Auszüge aus den Epithelkörperchen injiziert. Der Erfolg wurde am Ca-K-Gleichgewicht des Serums dieser Katzen bestimmt. Wie von *Trendelenburg* und *Goebel* [3]) angegeben wurde, ließ *Fetzer* die Serumproben, die vor und nach Beginn der Therapie entnommen wurden, auf das ausgeschnittene Froschherz einwirken. Eine Vermehrung der Ca-Ionen ließ sich nur in einem Teil der Transplantationsversuche nachweisen, während die Auszüge nur ausnahmsweise günstig einwirkten.

---

[1]) *Collip*, Journ. of biol. Chem. **63**, 395, 1925.

[2]) *Fetzer*, nicht gedruckte Dissertation. Freiburg i. Br., 1924.

[3]) *Trendelenburg* und *Goebel*, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm. **89**, 171, 1921.

Durch *Collips* Versuche, die von anderen[1]) bestätigt wurden, ist nun bekannt, daß zur Gewinnung wirksamer Extrakte eine Säurehydrolyse des Drüsenmaterials vorgenommen werden muß, und daß nur recht große Mengen verarbeiteten Drüsenmaterials den Ca-Gehalt der tetanischen oder normalen Tiere in die Höhe treiben. Die geringen Erfolge *Fetzers* erklären sich also durch die Tatsache, daß er keine Säurehydrolyse vornahm und relativ wenig Epithelkörperchen injizierte.

Ich habe nun eine Reihe von Versuchen ausgeführt, die die für die medizinische Praxis nicht unwichtige Frage entscheiden sollten, ob die zurzeit im Handel zu erhaltenden Epithelkörperchenauszüge das wirksame Hormon enthalten, und ob sich aus dem im Handel erhältlichen Trockenmaterial von Epithelkörperchen wirksame Extrakte gewinnen lassen.

Nachdem *Collip* nachgewiesen hat, daß wirksame Parathyreoidextrakte auch bei normalen Hunden eine Vermehrung des Serumkalkes herbeiführen, die so weit gehen kann, daß statt des normalen Wertes von rund 10 mg-Proz. Ca bis 23 mg-Proz. vorhanden sind, und daß schwere Hyperkalkämievergiftungen (Apathie, Koma, Tod) eintreten können, konnte auf die Erzeugung experimenteller Tetanie verzichtet werden. Vielmehr wurde bei normalen Katzen und Hunden der Blutkalkgehalt fortlaufend verfolgt. Katzen erwiesen sich übrigens für diese Versuche weit weniger geeignet als Hunde, die ich später allein verwandte. Die Tiere erhielten während der Versuchsdauer eine gleichmäßige Kost aus Krankenhausküchenabfall.

Zur Kalkbestimmung im Serum hielt ich mich an die relativ einfache und genaue Methode von *Tisdall* in der von *Collip* und *Clark* modifizierten Form. In 2 ccm verdünnten Serums wird mit Ammonoxalat das Ca gefällt, der abzentrifugierte Bodensatz von Ca-Oxalat wird mit verdünntem Ammoniak gewaschen. Die durch Zusatz von Schwefelsäure frei gemachte Oxalsäure wird mit n/100 Kaliumpermanganat bei 70° titriert. Da die Methode infolge der geringen absoluten Ca-Mengen relativ große Fehlerbreite hat, wurden immer mindestens zwei, oft drei Parallelbestimmungen ausgeführt, in den Protokollen führe ich den Mittelwert an.

1. Versuche mit Auszügen aus Epithelkörperchen nach Collip.

Für diese Vorversuche verwandte ich Epithelkörperchen vom Pferde, die im Schlachthaus abpräpariert und auf Eis gesammelt wurden. Die Auszüge bereitete ich nach den Angaben *Collips* oder nach den Angaben

[1]) *Ellingson, Bell* und *Hanson*, Proc. Soc. biol. Med. **21**, 1924; *Beermann*, ebendaselbst **21**, 456, 1924; *Collip, Clark* und *Leott*, Journ. of. biol Chem. **68**, 439, 1925; *Collip* und *Clark*, ebendaselbst **64**, 485, 1925.

von *Hanson*. Ich fand dabei die von den amerikanischen Autoren zuerst nachgewiesene erhebliche Steigerung des Blut-Ca, die nach wiederholten subkutanen Injektionen des vor der Einspritzung neutralisierten Auszuges allmählich einsetzte, aber in meinen Versuchen, bei denen insgesamt bis neun Epithelkörperchen eingespritzt wurden, nie so hohe Grade erreichte, als sie *Collip* (nach größeren Dosen) erhalten hat.

Ein Protokoll dieser Versuchsreihe, die ich gemeinsam mit Dr. *Schulten* und Dr. *Reinert* durchführte, findet sich in der Publikation von *Hans Schulten*[1]), so daß hier auf nähere Wiedergabe verzichtet werden kann. Bemerkt sei, daß wir, wie *Schulten* schon erwähnt, nicht selten vor dem Ansteigen des Blut-Ca ein vorübergehendes geringes Absinken beobachtet haben.

2. Versuche mit Parathyreoidextrakten des Handels und mit Auszügen aus Epithelkörperchenpulver des Handels.

Im ganzen habe ich vier Handelsauszüge untersucht. Von einer Nennung der Firmen nehme ich Abstand, da wohl alle Firmen zurzeit bemüht sind, die Wertigkeit ihrer Extrakte zu verbessern, und da zu hoffen ist, daß bald die jetzt noch unwirksamen Präparate durch wirksame ersetzt sein werden.

Präparat I. Eine Katze erhält im Laufe von 11 Stunden 20 ccm des neutralisierten Auszuges subkutan.

Serum-Ca: vorher = 11,3 mg-Proz., am Ende der Injektionsperiode = 10,3 mg-Proz., 15 Stunden nach Ende derselben 8,8 mg-Proz.

Also gab die Einspritzung keine Erhöhung, sondern eine leichte Senkung des Blutserum-Ca.

Ein junger Hund erhält innerhalb 6 Stunden insgesamt 14 ccm eines neutralisierten Auszuges aus Epithelkörperchen. Serum-Ca: vorher = 10,7 mg-Proz., am Ende der Injektionsperiode = 9,5 mg-Proz., 16 Stunden nach Ende derselben = 10,4 mg-Proz., 24 Stunden nach Ende der Injektionen 7,8 mg-Proz. und je 24 Stunden später 8,5, 10,1 und 8,2 mg-Proz.

Es fehlte also wieder eine Ca-steigernde Wirkung dieses Auszuges.

Präparat II. Eine Katze erhält auf einmal 10 ccm des neutralisierten Auszuges subkutan.

Serum-Ca: vorher = 11,1 mg-Proz., 8 Stunden nach der Injektion 11,4 mg-Proz., 24, 30, 54 Stunden nach der Injektion = 10,6, 11,2, 11,1 mg-Proz.

Einem jungen Hunde werden innerhalb 11 Stunden 30 ccm des gleichen Auszuges neutralisiert eingespritzt.

Serum-Ca: vorher = 10,0 mg-Proz., am Ende der Injektionsperiode = 8,9 mg-Proz., 26 Stunden nach Ende derselben 8,8 mg-Proz.

Auch dieser Auszug hatte also eher eine Ca-erniedrigende als erhöhende Wirkung.

Präparat III. Ein junger Hund (7 kg) erhält 8 ccm des Auszuges subkutan und je 2 ccm 15, 16, 17 und 18 Stunden nach der ersten Injektion.

Serum-Ca: vorher = 11,0 mg-Proz., 15 Stunden nach Beginn der Injektionen 12,8 mg-Proz., 39 Stunden nach Beginn der Injektionen 12,7 mg-Proz., weitere 30 Stunden später 11,3 mg-Proz.

---

[1]) *H. Schulten*, Klin. Wochenschr. 4, 1925, Nr. 52.

Ein junger Hund von 14 kg erhält auf einmal 20 ccm des Auszuges subkutan.

Serum-Ca: vorher = 9,6 mg-Proz., 14 Stunden nach der Injektion 10,4 mg-Proz., 24 Stunden nach der Injektion 9,3 mg-Proz.

Dieser Auszug hatte eine ganz unbedeutende erhöhende Wirkung auf den Serumkalkgehalt.

Präparat IV. Ein junger Hund (8 kg) erhält subkutan auf einmal 12 ccm des Auszuges = 1,2 g frische Drüse.

Serum-Ca: vorher = 11,8 mg-Proz., 15 Stunden nach der Injektion = 12,0 mg-Proz. 1, 2, 3, 4, 6, 7 Stunden nach der zweiten Serum-Ca-Bestimmung werden nochmals je 2 ccm des Auszuges eingespritzt. 8 Stunden nach Wiederbeginn der Injektionen = 12,2 mg-Proz., 16 Stunden später = 12,1 mg-Proz.

Der Auszug hatte also trotz der großen Drüsenmenge, die in ihm enthalten war, = 2,4 g Parathyreoidtrockensubstanz, keinen nennenswerten Einfluß auf den Kalkgehalt des Blutes.

8. Einfluß des Hämokrinin Blum auf den Blut-Ca-Gehalt.

F. Blum[1]) hat nachgewiesen, daß der Ausbruch von Krämpfen bei epithelkörperberaubten Tieren durch Verfütterung mit Blut oft verhindert werden kann. Er nimmt an, daß das im Blute enthaltene Epithelkörperhormon diese Schutzwirkung äußert. Hämokrinin ist ein das Hormon enthaltendes Bluttrockenpräparat.

In einem kurzfristigen Versuch hatte das Hämokrinin keine Wirkung auf die Blutserumkalkmenge.

Präparat *Hämokrinin.* Ein junger Hund erhält im Abstand von 5 Stunden je zehn Tabletten Hämokrinin mit der Schlundsonde

Serum-Ca: vorher 10,6 mg-Proz., 22, 54 und 74 Stunden nach der ersten Tablettengabe: 10,1, 10,2 und 10,6 mg-Proz.

Hämokrinin hatte also keinen den Blutplasma-Ca erhöhenden Einfluß.

Zusammenfassung.

Keines der Parathyreoidpräparate des Handels hatte eine sichere Wirkung auf den Serumkalkgehalt.

---

[1]) *F. Blum*, Arch. f. d. ges. Physiol. 208, 316, 1925.

Einige Beobachtungen über das Verhalten der Esterase bei der Autolyse der Leber.

Von

Hans Kosterlitz und **Helmut Petow.**

(Aus der I. medizinischen Klinik der Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 27. Mai 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Es ist eine lange bekannte Tatsache, daß das aus der Leber gewonnene lipolytisch wirkende Ferment sehr lange haltbar ist. So finden *J. H. Kastle* und *A. S. Loewenhart* (1) bei ihrer Darstellungsweise des Enzyms — Zerreiben des Organs mit Sand und Extrahieren mit Wasser, Kolieren durch ein Leintuch, wobei Gewebsstückchen ins Filtrat gehen — nicht nur keine Verminderung des Enzymgehalts innerhalb 48 Stunden, sondern eine recht stattliche Vermehrung. Bemerkenswert ist dabei, daß diese Präparate beim Filtrieren durch Papierfilter eine starke Verminderung ihrer Wirksamkeit zeigen, was möglicherweise so erklärbar ist, daß nur ein kleiner Teil des Enzyms gelöst ist, während der größere Teil an Zellsubstanz adsorbiert ist, die durch das Papierfilter zurückgehalten, durch Leintuch aber durchgelassen wird. Die Zunahme der Wirksamkeit dieser Suspension beim Stehen kann man nun, wie wir unten zeigen werden, durch eingetretene Autolyse erklären. In einer späteren Arbeit schreiben *J. H. Kastle, M. Johnston* und *E. Elvove* (2), daß ihre gewöhnlichen Extrakte aus Leber, wie oben beschrieben, auch wenn Toluol oder Thymol zugesetzt ist, bald ihre lipolytische Wirksamkeit verlieren, daß aber die „klaren Enzymlösungen" nach ihrer neuen Methode — Extraktion mit schwachen Säuren oder schwachen Alkalien und Filtration durch Papierfilter, wobei sich klare und wirksame Lösungen ergeben — selbst bei monatelangem Aufbewahren keinen nennenswerten Abfall ihrer lipolytischen Wirksamkeit zeigen; auch bei diesen klaren Lösungen war nach 6 Tagen ein wenn auch viel geringerer Anstieg der Wirksamkeit als bei den obigen Präparaten nachzuweisen. Auch *I. P. Simonds* (3)

beschreibt ähnliche Erscheinungen. Klare Enzymlösungen, die durch dreiwöchiges Extrahieren mit Glycerin erhalten wurden, denen nach beendeter Extraktion etwa 40 Proz. Wasser hinzugefügt wurde, zeigten nach zwei- bis dreijährigem Aufbewahren teils Zunahme, teils Abnahme, teils keine Veränderung der Wirksamkeit; dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß ein Teil der Lebern, aus denen das Enzym gewonnen war, von mit Phosphor oder Chloroform vergifteten Tieren stammte; eindeutig sind die Verhältnisse nicht. *E. Knaffl-Lenz* (4) beschreibt Leberpräparate, die ein Jahr nach der Herstellung keine wesentliche Veränderung der lipolytischen Wirksamkeit zeigten. *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) haben die Haltbarkeit von nach ihrer Methode gereinigten Präparaten untersucht, und fanden bei den meisten Präparaten verschiedener Reinheitsstufen in den ersten Tagen der Aufbewahrung eine Wirkungsabnahme um 20 bis 25 Proz. Später ging die Abnahme nicht weiter; Toluolzusatz übte keinen Einfluß auf die Haltbarkeit aus.

Gelegentlich anderer Untersuchungen über die Leberesterase hatten wir den sehr merkwürdigen Befund, daß ein mit Ringerlösung verdünnter Leberbrei, der wochenlang ohne Antisepticum bei Zimmertemperatur gestanden hatte und in Fäulnis übergegangen war, eine auffallend starke lipolytische Wirksamkeit zeigte, eine viel stärkere als man bei kurzdauernden Extraktionen aus der frischen Leber erhält. Zur Erklärung mußten folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Das Enzym wird durch autolytische Vorgänge freigelegt, wie es beim Invertin der Hefe geschieht. Auch bei der Esterase ist bereits die Autolyse zur Freilegung benutzt worden. So beschreibt *G. Peirce* (6) eine Methode zur Darstellung der Esterase, bei der die Organsuspension 24 Stunden bei 37° und mehrere Wochen bei Zimmertemperatur stehengelassen wird. Diese Manipulation wird Extraktion genannt, ist aber eigentlich eine weitgehende Autolyse. Auch bei den Präparaten von *J. H. Kastle, M. Johnston* und *E. Elvove* (2) und *J. P. Simonds* (3) hat anscheinend Autolyse bei der Darstellung mitgewirkt. Auf ähnliche Weise stellte *S. G. Hedin* (7) proteolytische Enzyme aus verschiedenen Organe her.

2. Es werden hemmende Begleitstoffe durch die Autolyse zerstört oder Aktivatoren gebildet und so eine Enzymvermehrung vorgetäuscht. Denn die Esterasewirkung ist nach den Untersuchungen von *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) von Begleitstoffen sehr abhängig.

3. Die Enzymvermehrung wird durch Vermehrung lipolytisch wirksamer Mikroorganismen hervorgerufen.

Um diese Verhältnisse zu klären, setzten wir aseptische Autolyseversuche an, über die wir im Folgenden berichten.

Angewandte Methode.

Messung der lipolytischen Wirksamkeit: Wir benutzten die stalagmometrische Messung der Tributyrinhydrolyse nach *P. Rona* und *L. Michaelis* in der Modifikation von *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) (8). Unser gerades Stalagmometer nach Traube hatte den Wasserwert von 43,8 Tropfen bei 20°; Anfangstropfenzahl der nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (8) gereinigten gesättigten Tributyrinlösung bei 20° 63,5 bis 64,5. Eine B. E. (Butyrase-Einheit) nannten wir in Anlehnung an *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (8) diejenige Enzymmenge, die bei 20° in 50 Minuten eine Tropfenzahlabnahme von 9,7 hervorbrachte. B. W. (Butyrase-Wert) bedeutet in Anlehnung an dieselben Autoren die Anzahl der B. E. pro Zentigramm Trockensubstanz. Als Puffer diente ein Ammoniaksalmiakpuffer (1 Teil Ammoniak + 8 Teile Ammoniumchlorid; 2,5 n).

Der Ansatz war folgender: 56 ccm Tributyrinlösung, 2 ccm Puffer, 2 ccm Enzymlösung nach eventuell nötiger Verdünnung.

In mehreren Versuchen haben wir die Hemmbarkeit des Enzyms durch Kalkseife-Albumin untersucht. Ansatz: 30 mg Eieralbumin, 56 ccm Tributyrinlösung, 0,5 ccm 2proz. Natriumoleatlösung, 0,5 ccm 2proz. Calciumchloridlösung, 2 ccm Puffer, 1 ccm Enzymverdünnung.

Die p_H haben wir, wenn sie nicht nur schätzungsweise angegeben ist, mit der Chinhydronelektrode in der Form von *E. Mislowitzer* (9) gemessen.

Die Trockensubstanzbestimmungen wurden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure vorgenommen.

Alle Messungen geschahen im klaren Filtrat des Autolysebreies. Die Methode der Autolyse wird jeweils bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Der Proteolysegrad wurde durch Reststickstoffbestimmung ermittelt. Die Stickstoffanalysen wurden mit den Mikroverfahren nach *J. Bang* bestimmt; anstatt der Jodometrie wandten wir die Acidimetrie mit 0,02 n Lösungen an. Zur Enteiweißung benutzten wir Trichloressigsäure.

Um einen Anhaltswert für den Gehalt der Leber an Enzym zu haben, der nach unseren Untersuchungen stark schwankt, trockneten wir immer eine Portion Leber mit Aceton und Äther nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5). Die getrocknete Leber extrahierten wir mit 0,025 n Ammoniak bis zur Erschöpfung und bestimmten in den einzelnen Portionen der Extraktionsflüssigkeit die Anzahl der B. E.

Was die Sterilität anbelangte, so ist sie für Versuche 3, 4 und 5 durch Kulturverfahren erwiesen[1]). Auch bei Versuch 1 und 2 waren keine Anhaltspunkte für etwa eingetretene Fäulnis vorhanden.

Vorversuch.

Der oben erwähnte Vorversuch verlief im einzelnen wie folgt: Leberbrei mit etwa der Hälfte seines Volumens mit Ringerlösung versetzt, stand wochenlang ohne Toluol bei Zimmertemperatur, war in Fäulnis übergegangen. Im Filtrat fand sich:

206 B. E. in 1 ccm; 2 ccm haben einen Trockenrückstand von 0,2150 g, was einem B. W. von 19,1 entspricht. Dieses Filtrat, mit dem Apparat von *H. Freundlich* und *L. Farmer-Loeb* (10) elektrodialysiert, ergab eine Konzentrationsvermehrung bis zu einem B. W. von 49. Einmalige Adsorption mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin und Elution mit 0,25 n Ammoniak nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) ergab ein Präparat vom B. W. von 80.

[1]) Wir danken Herrn Dr. *F. Lewy* aus der I. medizinischen Klinik für die Übernahme der bakteriologischen Untersuchungen.

Versuch 1.

Im ersten Versuch wollten wir das Verhalten der Esterase bei einer der Proteolyse günstigen p_H untersuchen. Dies ist nach den Untersuchungen von *P. Rona* und *E. Mislowitzer* (11) eine p_H von 3,6 bis 3,8. Ein Versuch bei dieser Reaktion, hergestellt mit 0,1 n Milchsäure-Puffer zeigte eine geringe Ausbeute und eine ziemlich schnelle Zerstörung des Enzyms. Aus diesem Grunde wählten wir eine p_H von etwa 4,7, bei der die Proteolyse nach den oben genannten Autoren allerdings nicht so weitgehend ist. Um nun doch eine vollkommenere Proteolyse zu erreichen, haben wir unter gleichzeitiger Dialyse gegen Pufferlösung autolysiert; denn nach den oben genannten Autoren geht die Autolyse durch Fortschaffen der Spaltprodukte schneller und vollständiger vonstatten. Als Material diente Schweineleber, die etwa 5 Stunden nach dem Tode des Tieres verwandt wurde; die Leber wurde so oft durch eine Fleischmaschine gedreht, bis weiteres Durchtreiben wirkungslos war.

a) 20,0 g frische Leber wird mit Aceton und Äther getrocknet, man erhält 4,91 g; das sind 24,5 Proz. Trockensubstanz. Durch erschöpfende Extraktion mit 0,025 n Ammoniak erhält man 2380 B. E., entsprechend einem B. W. für die getrocknete Leber von 4,8, für die frische Leber von 1,2. Die Extraktionsflüssigkeit wird mit Toluol versetzt, etwa 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, über Nacht bei 2° aufbewahrt. Am nächsten Tage erhält man 3420 B. E., entsprechend einem B. W. für die getrocknete Leber von 7,0 für die frische Leber von 1,7. Dieses bedeutet einen Zuwachs der Wirksamkeit um 44 Proz. Diese merkwürdige Erscheinung, die bei einem zweiten Versuch auch gefunden wurde, besprechen wir später.

b) 100 g Leberbrei wurden mit 200 ccm Acetatpuffer, bestehend aus 0,1 n Essigsäure und 0,1 n Natriumacetat zu gleichen Teilen, versetzt unter Zufügung von etwa 5 Proz. Toluol. Dieses Gemisch kam in den Thermostaten bei 37°.

c) 100 g Leberbrei wurden mit 200 ccm Acetatpuffer unter Zufügung von etwa 5 Proz. Toluol versetzt und in einen Dialysator getan, als Außenflüssigkeit diente derselbe Acetatpuffer mit Toluol. Der Dialysator wurde zur Vermeidung von Verdunstung mit einer Glasplatte unter Abdichtung mit Vaselin zugedeckt. Die Dialysierflüssigkeit wurde täglich gewechselt. Der Dialysator kam in den Thermostaten von 37°.

Die Resultate sind in Tabelle I und Abb. 1 niedergelegt.

Tabelle I.

Zeit Stdn.	Versuch mit Dialyse B. E. pro ccm	Versuch ohne Dialyse B. E. pro ccm	m. D./o. D.
6,5	12,5	7,3	1,7
16,0	54,0	15,7	3,4
26,0	44,0	6,0	7,3
32,0	40,8	8,7	4,7
40,5	15,0	4,4	3,4
49,5	11,4	5,2	2,2
65,0	4,6	6,5	0,71
72,5	4,7	5,6	0,84
87,5	1,8	10,3	0,17
95,0	0,58	10,5	0,06
117,0	0,02	7,2	0,003

Im Optimum unserer Kurve erhält man durch Autolyse mit Dialyse aus 1 g Leber 108 B. E., entsprechend einem B. W. von 1,08; dies bedeutet eine Ausbeute gegenüber der getrockneten Leber von 90 Proz. bzw. 64 Proz. Bei der Autolyse ohne Dialyse erhält man aus 1 g Leber im Optimum 31,4 B. E., entsprechend einem B. W. von 0,31, dies bedeutet eine Ausbeute von 26 bzw. 18 Proz. gegenüber der getrockneten Leber.

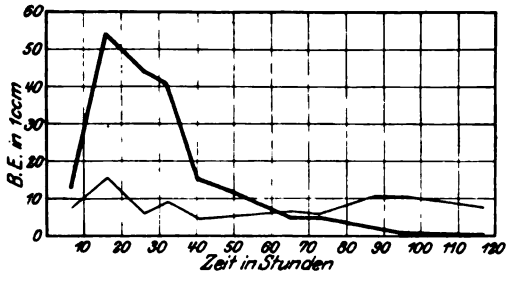


Abb. 1.

Autolyse mit Dialyse.
Autolyse ohne Dialyse.

Bei diesem Versuch ist es leider unterlassen worden, die p_H zu messen; bei dem Versuch mit Dialyse ist aber die Konstanz sicher, weil die Dialysierflüssigkeit — Puffer — täglich gewechselt wurde; bei dem Versuch ohne Dialyse ist die Konstanz sehr wahrscheinlich, wie sich das aus den späteren Versuchen ergibt. Es ist bei beiden Kurven nach 16stündigem Verlauf der Autolyse ein Maximum vorhanden, welches wir in späteren Versuchen wieder finden werden. Die Kurve des Versuchs mit Dialyse steigt zuerst viel steiler, als die des Versuchs ohne Dialyse, so daß sich im Maximum beider Kurven eine 3,4fach so starke Wirkung des Präparats mit Dialyse ergibt. Schnell aber fällt die lipolytische Wirksamkeit wieder ab, so daß nach 65stündiger Autolyse die beiden Kurven sich schneiden. Nach etwa 120 Stunden ist mit dem Präparat mit Dialyse fast keine lipolytische Wirkung mehr zu erlangen, während der Gehalt des anderen Präparats ebenso groß ist wie am Anfang der Autolyse.

Der schnellere Anstieg des Präparats mit Dialyse am Anfang wäre auf zwei Arten zu erklären. Entweder durch stärkeren enzymatischen Abbau des Protoplasmas der Leberzellen und dadurch bedingte Herauslösung der Esterase aus ihrer Bindung; oder durch Wegfall von Hemmungsstoffen Nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) sind solche Hemmungsstoffe z. B. die Gallensäuren. Wir kommen darauf noch einmal zurück.

Zur Erklärung des schnelleren Abfalls der lipolytischen Wirksamkeit während der Autolyse bei gleichzeitiger Dialyse möchten wir eine Beobachtung von *R. Magnus* (12) heranziehen. Dieser Autor dialysierte ein Leberesterasepräparat, das durch Extrahieren mit toluolgesättigter 0,9proz. Natriumchloridlösung aus fein zerriebener Leber und nachfolgendes Ausfällen des größten Teiles des Eiweißes durch Uranylacetat erhalten war, mehrere Tage; die Wirksamkeit war sehr herabgemindert. Wenn er hierzu einige Kubikzentimeter des gekochten Lebersaftes hinzufügte, so war die alte Wirksamkeit wieder hergestellt. Auch *E. Abderhalden* und *A. Weil* (13) beschreiben bei der Ultrafiltration analog eine Aktivierung des Filterrückstandes durch das Ultrafiltrat. Hiernach könnte man annehmen,

daß allein durch die Dialyse Aktivatoren entfernt würden. Man muß aber andererseits auch daran denken, daß durch den beschleunigten enzymatischen Abbau bei der Autolyse mit Dialyse Schutzkörper der Esterase zerstört werden können. Für den zweiten Anstieg des Präparats ohne Dialyse haben wir keine Erklärungsmöglichkeit.

Versuch 2.

Der zweite Versuch sollte zur Klärung der Frage dienen, wie sich die Hemmbarkeit der Esterase im Verlauf der Autolyse verhält. Gleichzeitig wollten wir den Verlauf bei einer anderen p_H prüfen; dazu pufferten wir mit primärer Natriumphosphatlösung, die nach *P. Rona* und *E. Mislowitzer* (11) bei der gleichen p_H günstiger als Acetatpuffer auf die Proteolyse wirkt. Zur experimentellen Prüfung der Hemmbarkeit der Esterase benutzten wir die Methode von *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5), nämlich der Hemmung mit Kalkseifenalbumin. Wir waren uns bewußt, daß dies nur eine unvollkommene Prüfung darstellen konnte, wie es auch die Autoren bei der Leberesterase hervorheben, denn bei der Dialyse diffundieren nicht nur Seifen, sondern vor allem auch gallensaure Salze. Aber zur Herstellung einer ausgleichenden Hemmung im Sinne der oben genannten Autoren wären eingehende Vorversuche nötig gewesen, die uns zu weit ab geführt hätten. So hielten wir uns an die schon vorhandene Methodik. Im übrigen wandten wir dieselben Anordnung an wie bei Versuch 1.

a) 25,0 g frischer Leberbrei geben bei der Trocknung 4,775 g, dies sind 19 Proz. Trockensubstanz. Darin sind enthalten 3540 B. E.; unter Hemmung 1620 B. E. Darauf wurde Toluol zur Extraktionsflüssigkeit gegeben, bei Zimmertemperatur etwa 6 Stunden stehengelassen; über Nacht wurde sie bei 2° aufgehoben. Am nächsten Tage wurde die Untersuchung wiederholt; es fanden sich 5570 B. E.; unter Hemmung 1940 B. E. Dieses bedeutet einen Zuwachs an Wirksamkeit von 57 Proz. ohne Hemmung und von nur 20 Proz. unter Hemmung, d. h. also, die Wirksamkeit aber auch die Hemmbarkeit haben zugenommen.

	Am 1. Tage	Am 2. Tage
B. W. der frischen Leber ohne Hemmung . . .	1,4	2,2
B. W. der getrockneten Leber ohne Hemmung .	7,4	11,7
B. W. der frischen Leber mit Hemmung	0,65	0,78
Hemmbarkeit	54 Proz.	65 Proz.

In welcher Richtung soll man für diesen bereits beim ersten Versuch beobachteten merkwürdigen Befund eine Erklärungsmöglichkeit suchen?

1. Es könnte eine Enzymbildung aus Zymogen stattgefunden haben.

2. Könnten durch autolytischen Abbau Hemmungsstoffe fortgeschafft worden sein. Das aber ist unwahrscheinlich, da wir ja mit 0,025 n Ammoniak extrahiert haben und bei der alkalischen Reaktion nach den Untersuchungen von *P. Rona* und *E. Mislowitzer* (11) mindestens die Proteolyse stark gehemmt ist.

3. Könnte man an eine Aktivierung durch Toluol denken, wie das *J. H. Kastle* und *A. S. Loewenhart* (1) bei der Leberesterase beobachtet haben. Wird doch auch nach *C. S. Hudson* (14) und *R. Willstätter* und *F. Racke* (15) die Freilegung des Invertins aus Hefe durch Toluol beschleunigt.

Zur Autolyse wurde angesetzt:

b) 57,5 g Leberbrei wurden mit 115 ccm m/15 primärer Natriumphosphatlösung unter Zufügung von Toluol versetzt und wie bei Versuch 1 unter gleichzeitiger Dialyse autolysiert.

Tabelle II.

Zeit Stdn.	Ohne Hemmung B. E. pro ccm	Mit Hemmung B. E. pro ccm	Hemmung Proz.
9,0	150,0	86,5	42
22,5	144,0	93,5	35
29,5	172,0	76,5	56
52,5	46,0	16,0	65
98,0	23,5	9,1	61
123,0	30,5	7,5	75
175,0	16,0	4,5	72
435,0	0,0	0,0	—

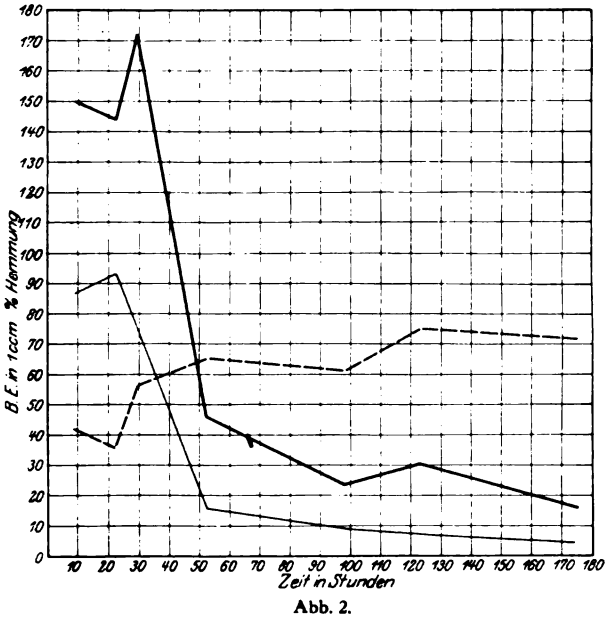


Abb. 2.

Ohne Hemmung.
Mit Hemmung.
Hemmung in Proz.

Optimale Ausbeute. 1. Ohne Hemmung: nach 29,5 Stunden 344 B. E. pro Gramm Leber, entsprechend einem B. W. von 3,4, dies sind 243 bzw. 155 Proz. Ausbeute im Verhältnis zur getrockneten Leber.

2. Mit Hemmung: nach 22,5 Stunden 187 B. E. pro Gramm Leber, entsprechend einem B. W. von 1,87; dies sind 288 Proz. bzw. 240 Proz. Ausbeute im Verhältnis zur getrockneten Leber.

Auf jeden Fall ergibt sich also eine Ausbeute von über 100 Proz. Ist dies nun ein *tatsächliches* Mehr an Ausbeute, hervorgerufen durch enzymatische Freilegung der Esterase, oder nur ein *scheinbares* Mehr durch Fort-

schaffung von Hemmungskörpern? Wir neigen mehr zu der Meinung, daß ein tatsächliches Mehr vorhanden ist, weil die Hemmbarkeit, die bei Schweineleber bei unserer Versuchsanordnung etwa 60 Proz. betragen sollte, während des Maximums anstatt erhöht, stark herabgesetzt ist. Sicheres kann man aber daraus nicht schließen, weil unser Hemmungssystem nicht dem Milieu des Enzyms angepaßt ist. Im weiteren Verlauf der Autolyse nimmt die Hemmbarkeit der Esterase stark zu, so daß sie zum Schluß beinahe 200 Proz. des Anfangswertes beträgt. Den starken Abfall der lipolytischen Wirksamkeit möchten wir, wie bei Versuch 1, erklären.

Ob die bei dieser Versuchsanordnung — Phosphatpuffer — im Gegensatz zum ersten Versuch höhere — scheinbare oder tatsächliche — Ausbeute an Esterase im Verhältnis zum Verfahren von *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) der anderen p_H oder den anderen Anionen zu verdanken ist, bleibe dahingestellt. Es sei nur daran erinnert, daß auch in den Untersuchungen von *P. Rona* und *E. Mislowitzer* (11) bei gleicher p_H im Phosphatpuffer eine stärkere Proteolyse stattfindet, als im Acetatpuffer. Vielleicht zeigt sich hierin ein neuer präparativer Weg, der vor dem Verfahren der Trocknung der Leber den Vorzug größerer Einfachheit hätte. Es wäre dann natürlich wichtig, die Adsorptionsfähigkeit der Esterase aus dem Autolysesaft zu untersuchen, worüber wir weiter unten einige Versuche mitteilen werden.

Versuch 3.

In diesem Versuch wollten wir untersuchen, wie sich die Hemmbarkeit des Enzyms während der Autolyse *ohne* gleichzeitige Dialyse verhält. Gleichzeitig stellten wir den Grad der proteolytischen Spaltung fest. Außerdem wollten wir untersuchen, wie sich die Esterase verhält, wenn die Autolyse des Leberbreies verhindert oder sehr verzögert wird. Dazu sind zwei Wege möglich: Entweder unter Einwirkung eines selektiven „Giftes" auf die Abbauenzyme, wie es *R. Willstätter* und *F. Racke* (15) bei der Freilegung des Invertins angewandt haben, oder durch niedrige Temperatur, wobei alle enzymatischen Vorgänge hintangehalten werden. Wir haben uns der Einfachheit halber für den letzteren Weg entschieden. Für die genauere Analyse der Vorgänge bei der Freilegung der Esterase ist aber die selektive „Vergiftung" der einzelnen Abbauenzyme das Gegebene. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß es möglich sein kann, durch selektive Hemmung der einzelnen autolytischen Enzyme festzustellen, an welches Substrat die Esterase in der Leberzelle gebunden ist, analog dem Vorgange von *R. Willstätter* und *F. Racke* (15) bei der Freilegung des Invertins.

a) 36,6 g frischer Schweineleberbrei ergaben nach der Trocknung mit Aceton und Äther 9,71 g Trockensubstanz; dies sind 26,5 Proz. Diese ergaben bei erschöpfender Extraktion 12120 B. E., mit Hemmung 4335 B.E., was eine Hemmung von 64 Proz. bedeutet. Hier ist die Untersuchung am nächsten Tage wie in Versuch 1 und 2 nicht wiederholt worden. B. W. für frische Leber 3,3, für getrocknete Leber 12,5. B. W. bei Hemmung für frische Leber 1,2, für getrocknete Leber 4,5.

Zur Autolyse wurden angesetzt:

b) 104,2 g Leberbrei mit 208,4 ccm m/9 primärer Natriumphosphatlösung. Dieses Gemisch kam in den Thermostaten von 37°.

c) 104,7 g Leberbrei mit 209,4 ccm m/9 primärer Natriumphosphatlösung. Dieses Gemisch wurde bei 2° aufgehoben.

Die Resultate sind in Tabelle III und Abb. 3 niedergelegt. Als Maß für die proteolytische Spaltung zeichneten wir in die Abbildung die Rest-

stickstoffwerte ein, abzüglich des Anfangswertes des Gemisches bei 2°. Die p_H-Werte wurden elektrometrisch gemessen und erwiesen sich als genügend konstant.

Tabelle III.

Zeit Stdn.	Ohne Hemmung B. E. pro ccm	Mit Hemmung B. E. pro ccm	Hemmung Proz.	Trocken-gewicht pro ccm g	B. W. ohne Hemmung	p_H	Rest-N g-Proz.
			$t = 37°$				
1,0	27,2	11,9	56	0,0571	4,8	5,99	0,101
8,0	30,0	11,7	61	0,0630	4,8	6,06	0,279
22,0	48,4	16,6	66	0,0653	7,4	6,04	0,427
31,5	57,2	16,5	71	—	—	5,92	0,416
48,0	47,6*)	16,1*)	66	0,0768	6,2	5,98	0,495
71,5	50,4	21,2	58	—	—	5,96	0,545
97,0	92,0	31,7	66	0,0727	12,7	5,97	0,540
119,0	72,5	30,5	58	—	—	5,97	0,585
145,0	92,0	31,9	65	0,0815	11,3	6,03	0,573
191,0	95,0	36,0	62	0,0839	11,3	5,99	0,622
			$t = 2°$				
5,5	27,2	9,7	64	0,0511	5,3	5,97	0,089
29,5	27,2	10,2	63	—	—	5,93	0,105
72,5	21,6	8,4	61	0,0605	3,6	5,96	0,134
121,0**)	28,0	10,5	63	—	—	6,00	0,179

*) Zu diesem Werte wollen wir bemerken, daß er gemessen wurde, nachdem das Filtrat 5 Tage bei 2° gestanden hatte. Der Wert gleich nach der Filtration ergab in Doppelbestimmungen merkwürdigerweise folgendes: Ohne Hemmung 25,4 B. E., mit Hemmung 18,0 B. E., entsprechend einer Hemmung von 29 Proz. Wir haben diese Werte wegen ihrer Unwahrscheinlichkeit nicht in die Tabelle eingetragen.

**) Die Temperatur war bei Abnahme dieser Probe 8°, da das Eis ausgegangen war; dadurch erklärt sich der Anstieg der Kurve der Proteolyse und vielleicht auch der Anstieg der lipolytischen Wirksamkeit.

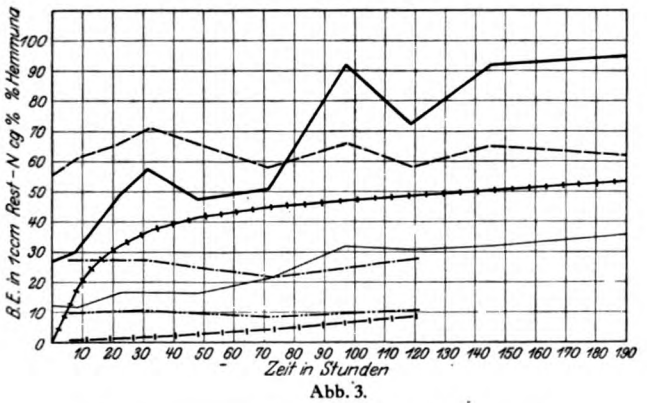


Abb. 3.

Versuch bei 37°:
- Ohne Hemmung.
- Mit Hemmung.
- Hemmung in Proz.
- Proteolysegrad (s. Text).

Versuch bei 2°:
- Ohne Hemmung.
- Mit Hemmung.
- Proteolysegrad (s. Text)

Im Optimum sind aus 1 g Leber nach 191 Stunden frei gelegt 190 B. E., entsprechend einem B. W. von 1,9; Ausbeute 58 Proz. gegenüber der getrockneten Leber. Mit Hemmung nach derselben Zeit 72 B. E., entsprechend einem B. W. von 0,72; Ausbeute 60 Proz. Bemerkenswert ist in diesem Versuch der zweite große Anstieg der lipolytischen Wirksamkeit, nachdem die proteolytische Spaltung schon vorher stark verlangsamt war. Im Versuch 1 hatten wir bei der Reihe ohne Dialyse auch einen, wenn auch viel geringeren zweiten Anstieg. Vielleicht bedingen Aktivatoren, die durch die Autolyse entstehen, diese Steigerung. Auf jeden Fall kann man sagen, daß die Verstärkung der lipolytischen Wirksamkeit nicht eindeutig von der eingetretenen Proteolyse abhängig ist. Die Hemmbarkeit zeigte geringe Schwankungen, die aber mit den Veränderungen der lipolytischen Wirksamkeit nicht eindeutig konform gingen. Aber im ganzen zeigte die Kurve mit Hemmung nicht die großen Schwankungen der Kurve ohne Hemmung.

Bei dem Versuch bei 2° zeigte sich eine sehr geringe proteolytische Spaltung. Es war keine nennenswerte Steigerung der lipolytischen Wirksamkeit vorhanden, eher eine vorübergehende Abnahme. Aber es ließ sich doch Esterase aus der Leber herausholen, wenn auch erheblich weniger. Die autolytischen Vorgänge spielen also *auf jeden Fall* eine große Rolle bei der Verstärkung der lipolytischen Wirksamkeit. Die Hemmbarkeit war nahezu konstant.

Es war nun die Möglichkeit vorhanden, daß während des Transportes der Leber vom Viehhof ins Laboratorium schon eine Autolyse stattgefunden hatte, wodurch die Esterase freigelegt war. Um dies zu untersuchen, stellten wir einen Versuch an frischer Kaninchenleber an.

Versuch 4.

Ein Kaninchen wird, nachdem die Bauchhaut enthaart ist, durch Entbluten aus der Carotis getötet. Sofort nach eingetretenem Tode wird unter peinlichst aseptischen Kautelen die Leber herausgenommen, vermittelst Kältemischung stark abgekühlt, durch einen sterilisierten Latapie gedreht und sofort wieder gekühlt. Der erhaltene Leberbrei wird in drei Teile geteilt: a) dient zur Herstellung eines Trockenpräparats; b) und c) werden in vorgewogene sterilisierte weithalsige Erlenmeyerkolben eingefüllt, gewogen und mit der doppelten Menge gekühlter steriler m/10 primärer Natriumphosphatlösung versetzt, b) kommt in den Thermostaten von 37°, c) wird bei 2° aufgehoben. Toluol wurde *nicht* dazugesetzt. Die Sterilität ist erwiesen worden.

a) 10,64 g frischer Leberbrei ergeben 2,655 g Trockensubstanz. Dies sind 25,0 Proz. Darin sind enthalten 3920 B. E., entsprechend einem B. W. für die frische Leber von 3,7, für die getrocknete Leber von 14,8. Durch Kalkseifenalbuminzusatz wird eine Hemmung von 24 Proz. hervorgerufen.

b) 20,65 g Leberbrei werden versetzt mit 41,3 ccm m/10 primärer Natriumphosphatlösung; 37°.

c) 15,07 g Leberbrei werden versetzt mit 30,14 ccm m/10 primärer Natriumphosphatlösung; 2°.

Wegen Materialmangels war es uns nicht möglich, die p_H elektrometrisch zu messen. Angenäherte kolorimetrische Messungen ergaben eine geringe Säuerung während der Autolyse; die p_H bewegt sich um den Umschlagspunkt des Methylrot. Das Filtrat der Probe nach 97,5 Stunden wurde elektrometrisch gemessen und ergab ein γ_H von 5,51.

Tabelle IV.

Zeit Stdn.	Ohne Hemmung B. E. pro ccm	Mit Hemmung B. E. pro ccm	Hemmung Proz.	Rest-N g-Proz.
		$t = 37^0$		
1,75	43,8	35,5	19	0,220
8,5	64,3	41,4	36	0,350
23,5	30,5	18,6	39	0,695
47,5	28,5	21,0	26	0,820
97,5	24,3	17,2	29	1,05
		$t = 2^0$		
6,5	35,0	22,7	35	0,113
24,0	28,6	16,9	41	0,115

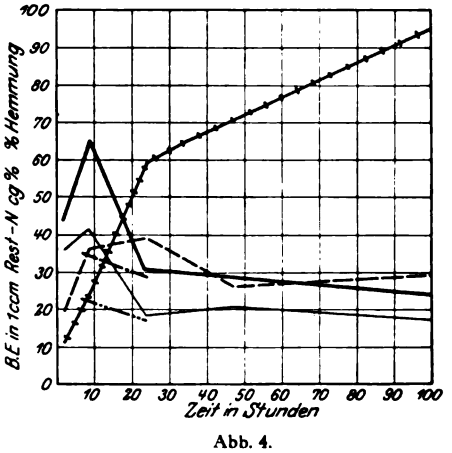


Abb. 4.

Versuch bei 37°: Ohne Hemmung. Mit Hemmung. Hemmung in Proz. Proteolysegrad (s. Text bei Versuch 3).

Versuch bei 2°: Ohne Hemmung. Mit Hemmung.

Die Kurve bei 37° ergab nach 8,5 Stunden in 1 g Leber 128,6 B. E., entsprechend einem B. W. von 1,3; Ausbeute 35 Proz. Bemerkenswert an diesem Versuch ist, daß wir wieder am Anfang einen Anstieg der lipolytischen Wirksamkeit finden, der mit dem Grad der Proteolyse konform zu gehen scheint; dann aber fällt die Wirksamkeit stark ab, während die Proteolyse noch weiter stark ansteigt. Nach etwa 25 Stunden verlaufen sowohl die Kurve der lipolytischen Wirksamkeit als auch die der eingetretenen Proteolyse viel flacher, so daß es den Anschein hat, als ob im Anfang eine Freilegung von Esterase stattfindet — vorausgesetzt, daß keine Hemmungskörper zerstört werden — während dann beim weiteren Fortgang der Autolyse ähnlich den Versuchen 1 und 2 die Stabilität der Esterase leidet. Die Kurve bei 2° ergibt, daß man durch einfache

Extraktion bei schwach saurer Reaktion eine gewisse Menge Ferment herauslösen kann, daß also nicht die ganze Esterase festgebunden ist. Im übrigen ergibt sich hier, daß innerhalb 24 Stunden ein beträchtlicher Abfall der lipolytischen Wirksamkeit zu konstatieren ist.

Versuch 5

ist eine Wiederholung von Versuch 4. Versuchsanordnung wie dort. 10,60 g frischer Leber ergeben getrocknet 2,60 g, dies sind 24,5 Proz. Darin enthalten sind 2517 B. E. bei einer Hemmbarkeit von 36 Proz., entsprechend einem B. W., für frische Leber von 2,4, für getrocknete Leber von 9,7.

Was die p_H anbetrifft, wurde sie wieder annähernd kolorimetrisch gemessen. Es ergab sich keine Veränderung; wieder Umschlagspunkt des Methylrots.

In dem Versuch bei 37° wurde nach 25 Stunden mit Sulfosalicylsäure nur eine Spur einer Vermehrung der schon an und für sich vorhandenen Trübung gefunden. Diese Trübung war auch in der Extraktionsflüssigkeit der getrockneten Leber zu finden; war also nicht auf Lipoide zurückzuführen.

Tabelle V.

Zeit Stdn.	Ohne Hemmung B. E. pro ccm	Mit Hemmung B. E. pro ccm	Hemmung Proz.	Rest-N g-Proz.
		$t = 2^0$		
3,0	34,5	—	—	0,13
13,0	35,0	22,8	35	0,115
31,0	16,5	13,5	18(!)	0,12
		$t = 37^0$		
3,0	20,0	11,8	41	0,11
13,0	21,0	14,3	32	0,275
25,0	0,0	0,0	—	0,54

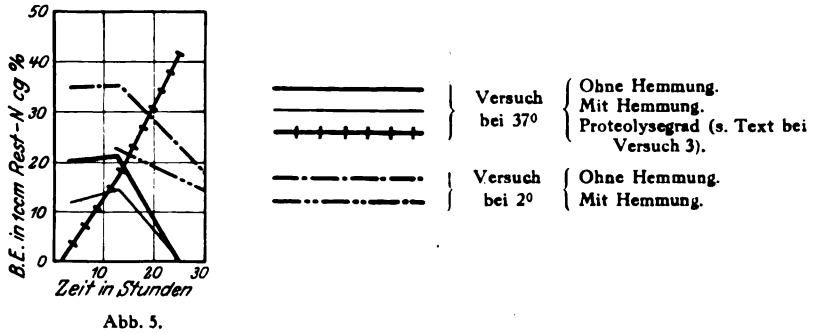


Abb. 5.

Im Optimum sind — und zwar liegt es merkwürdigerweise im Versuch bei 2° — in 1 g Leber 70 B. E. enthalten, entsprechend einem B. W. von 0,70; das sind 29 Proz. Ausbeute.

Wie wir aus der Kurve ersehen, verläuft dieser Versuch ganz anders als alle übrigen Versuche. Wir glauben, daß es sich hier um einen Ausnahmeverlauf handelt, dessen Ursache nicht geklärt ist; denn die proteolytische Spaltungsgeschwindigkeit nimmt im Verlauf der Autolyse zu anstatt ab.

Bemerkenswert ist bei den Kaninchenversuchen, daß die mittlere Hemmbarkeit ungefähr nur die Hälfte der der Schweineleberesterase beträgt.

Reinigung der Autolysate durch Adsorption und Elution nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5).

Versuch 6. Adsorptionsversuch mit Präparat aus Versuch 2.

Gleichzeitig mit dem oben beschriebenen Autolyseversuch 2 haben wir noch in einem Parallelversuch 102,5 g frischen Leberbrei mit 205 ccm m/15 primärer Natriumphosphatlösung + Toluol + Dialyse angesetzt. Nach 22,5 Stunden trennten wir die Flüssigkeit von dem Leberbrei.

Das klare Filtrat wurde bei 2° mit Toluolzusatz aufgehoben; nach 10 Tagen waren in 1 ccm 153 E. bei einer Hemmbarkeit von 59 Proz. enthalten. 5 ccm hatten einen Trockengehalt von 0,252 g; entsprechend einem B. W. von 30. 42 Tage später war in 1 ccm nur 69 B. E. enthalten. 2 ccm hatten einen Trockengehalt von 0,103 g, entsprechend einem B. W. von 13,4. Auffallend ist es, daß innerhalb von 42 Tagen über 50 Proz. des Esterasegehalts verloren gegangen sind, wie es bei Präparaten höheren Reinheitsgrades, die von Schutzstoffen entblößt sind, vorkommt. Von dieser Esteraselösung nahmen wir 48 ccm, verdünnten sie auf 600 ccm unter Hinzufügung von 20 ccm n Essigsäure. Wir hatten so eine Konzentration von 5,5 B. E. pro Kubikzentimeter; p_H des Ansatzes war 4,1. Daraus absorbierte elektroosmotisch gereinigtes Kaolin, das uns freundlicherweise die Elektro-Osmose A.-G. in Berlin zur Verfügung stellte, folgendermaßen:

1,2 mg Kaolin pro B. E. . . . . 72 Proz. der Esterase
1,8 „ „ „ B. E. . . . . 96 „ „ „

Angewandt wurden 1,7 mg pro B. E.

520 ccm des Versuchsansatzes — 2860 B. E. — wurden mit 4,9 g Kaolin adsorbiert. Elution mit 350 ccm 0,25 n Ammoniak. Eindampfen im Vakuum, abzentrifugieren vom ausgefallenen Kaolin, auffüllen auf 100 ccm. Man erhält 1004 B. E., dies sind 35 Proz. Ausbeute. Die Elution zeigte eine Hemmbarkeit von 64 Proz.

Trockengehalt von 10 ccm 0,0099 g, entsprechend einem B. W. von 101. Konzentrationsvermehrung gegenüber der getrockneten Leber 13,6- bzw. 8,6fach. Wenn man in Betracht zieht, daß wir hier anscheinend keine optimalen Bedingungen haben und daß während des langen Lagerns der Ausgangslösung große Fermentverluste eingetreten sind, so ist das ein ganz gutes Resultat.

Versuch 7. Adsorptionsversuch mit Präparat aus Versuch 3.

Gleichzeitig mit dem Autolyseversuch wurden im Parallelversuch 102,8 g Leberbrei mit 205,6 ccm m/9 primärer Natriumphosphatlösung + Toluol ohne Dialyse angesetzt. Nach 25 Stunden wurde filtriert. Nach 10 Tagen waren in 1 ccm 36 B. E. enthalten, davon wurden 80 ccm unter Hinzufügung von 20 ccm n Essigsäure auf 600 ccm aufgefüllt. Wir hatten also eine Konzentration von 4,8 B. E. pro Kubikzentimeter. 5,6 mg Kaolin pro B. E. adsorbierten 73 Proz. der Esterase; also eine sehr schlechte Adsorbierbarkeit.

540 ccm des Ansatzes — 2590 B. E. — wurden mit 14,4 g Kaolin versetzt. Elution mit 360 ccm 0,25 n Ammoniak; es wurde im Vakuum eingedampft, vom ausgefallenen Kaolin durch Zentrifugieren getrennt, auf 100 ccm aufgefüllt. Es ergaben sich 1000 B. E. bei der Hemmbarkeit von 70 Proz.; also 39 Proz. Ausbeute. Trockenrückstand von 10 ccm 0,0260 g entsprechend einem B. W. von 38,5. Konzentrationsvermehrung gegenüber der getrockneten Leber also nur 3,1fach.

Um zu prüfen, ob die schlechte Adsorbierbarkeit vielleicht eine Eigentümlichkeit der betreffenden Leber sei, prüften wir das getrocknete Präparat, nachdem wir es nach *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) mit n/40 Ammoniak extrahiert im 30° warmem Luftstrom eingedampft und 0,44 g in 132 ccm Wasser unter Hinzufügung von 4,4 ccm 0,25 n Ammoniak wieder aufgelöst hatten. Es ergab sich, nachdem 4,6 ccm n Essigsäure hinzugesetzt waren:

Bei einer Konzentration von 7,6 B. E. pro Kubikzentimeter adsorbierten:

1,75 mg Kaolin pro B. E. . . . . 95 Proz. der Esterase
2,6 „ „ „ B. E. . . . . 97 „ „ „

Das Trockenpräparat war also recht gut adsorbierbar.

Wir können diesen Versuchen allerdings nur einen geringen Wert beilegen, da wir offenbar keine optimalen Bedingungen — Wahl des Adsorbens, Mengenverhältnisse, Reaktion — für die Adsorption und Elution haben, sondern einfach die Vorschrift von *R. Willstätter* und *Fr. Memmen* (5) auf unsere Verhältnisse übertragen haben.

Zusammenfassung.

1. Es gelingt durch Autolyse, Lösungen mit stärkerer lipolytischer Wirksamkeit zu erhalten, als ohne Autolyse durch einfache Extraktion bei 2°; ob diese Zunahme durch Freilegung von Enzym oder durch Fortfall von Hemmungsstoffen bzw. Bildung von Aktivatoren zustande kommt, ist schwierig zu entscheiden.

2. Vergleicht man die Ergebnisse der Autolyse *mit* und *ohne* Dialyse, so ergibt sich bei den Versuchen *ohne* Dialyse (III und IV) beide Male im Anfang ein Anstieg der Wirksamkeit; bei Versuch III nach einiger Zeit ein weiterer Anstieg, während bei Versuch IV die Wirksamkeit schnell abnimmt, um dann annähernd konstant zu bleiben. Bei den Versuchen *mit* Dialyse (I und II) ergibt sich, daß die lipolytische Wirksamkeit zwar schnell einen hohen Grad erreicht, aber schnell wieder bis auf Null abfällt. Mit Dialyse erhält man Präparate höherer Wirksamkeit als ohne Dialyse.

3. Die Hemmbarkeit der Esterase steigt im Verlauf der Autolyse *mit* Dialyse (II) stark an, während sie bei der Autolyse *ohne* Dialyse (III und IV) schwankt.

4. Wenn es zutrifft, daß durch die mit Dialyse kombinierte Autolyse eine wirklich weitergehende Freilegung der Esterase durch Lösung der adsorptiven Bindung an das Protoplasma stattfindet und nicht nur eine Fortschaffung von Hemmungsstoffen, so bedeutet der Weg, den wir in Versuch II eingeschlagen haben, eine aussichtsreiche Möglichkeit präparativer Darstellung der Leberesterase.

Wir sind uns bewußt, daß die im vorstehenden mitgeteilten Versuche nicht zahlreich genug sind, um die angeschnittenen Fragen zu lösen. Sie waren, wie erwähnt, unternommen zur Klärung eines Neben-

befundes. Dennoch glauben wir, die Resultate unserer Bemühungen der Öffentlichkeit übergeben zu sollen, da wir meinen, daß sie eine Anregung sein können, während uns selbst die Zeit fehlt, sie in genügender Weise auszubauen.

Literatur.

1) *J. H. Kastle* und *A. S. Loewenhart*, Amer. Chem. Journ. **24**, 491, 1900. — 2) *I. H. Kastle, M. Johnston* und *E. Elvove*, ebendaselbst **31**, 521, 1904. — 3) *I. P. Simonds*, Amer. Journ. Phys. **48**, 141, 1919. — 4) *E. Knaffl-Lenz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **97**, 242, 1923. — 5) *R. Willstätter* und *Fr. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 216, 1924. — 6) *G. Peirce*, Journ. of biol. Chem. **16**, 1, 1913. — 7) *S. G. Hedin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **122**, 307, 1922; **125**, 289, 1923. — 8) *R. Willstätter* und *Fr. Memmen*, ebendaselbst **129**, 1, 1923. — 9) *E. Mislowitzer*, diese Zeitschr. **159**, 72, 1925. — 10) *H. Freundlich* und *L. Farmer Loeb*, ebendaselbst **150**, 522, 1924. — 11) *P. Rona* und *E. Mislowitzer*, ebendaselbst **140**, 517, 1923. — 12) *R. Magnus*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 149, 1904. — 13) *E. Abderhalden* und *A. Weil*, Fermentforschung **4**, 76, 1921. — 14) *C. S. Hudson*, Journ. Amer. Chem. Soc. **36**, 1566, 1914. — 15) *R. Willstätter* und *F. Racke*, Liebigs Ann. **425**, 1, 1921.

Zur Kenntnis des Ovarialhormons.

Von

Max Hartmann und Hans Isler.

(Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel.)

(Eingegangen am 30. Mai 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die rasch aufeinanderfolgenden Publikationen über das Hormon der weiblichen Geschlechtsdrüsen veranlassen uns, einige Resultate unserer Untersuchungen mitzuteilen, bevor diese Arbeiten völlig abgeschlossen sind. Einen neuen Impuls hat die Forschung über die wirksamen Bestandteile von Follikelsaft, Corpus luteum und Placenta erhalten durch die schöne Methode von *Allen* und *Doisy*[1]) der künstlichen Brunsterzeugung an kastrierten Ratten durch Injektion von Extrakten aus diesen Organen. Weitere Beiträge und Ausarbeitungen dieser Methode haben dann *Loewe*, *Zondek* und andere beigesteuert[2]). Da die neuere Literatur an verschiedenen Stellen[3]) gesammelt ist, sei uns die Zitierung der einzelnen Arbeiten erlassen. Es sei nur darauf verwiesen, daß *Fränkel* und *Herrmann*, sowie *Seitz* und *Wintz* und weiter *Fellner* schon vor 10 Jahren Hormone aus Corpus luteum, Ovarien und Placenten gewannen, die in naher Beziehung stehen zu dem von *Allen* und *Doisy* untersuchten Produkt. *Allen* und *Doisy* haben in ihrer Publikation auch das Verfahren von *Fränkel* und *Herrmann* als den Weg beschrieben, der zu oestrogenen Substanzen führt. Sie drücken aber ihr Erstaunen darüber aus, daß die danach hergestellte Substanz nicht im Handel erhältlich sei, und sie vermuten, daß das Verfahren

---

[1]) Journ. of the americ. med. Assoc. 81, 819 bis 821, 1925.

[2]) Nach Fertigstellung dieser Arbeit ist uns eine Publikation von *Frank* und *Gustavson* zu Gesicht gekommen (Journ. Amer. med. Assoc. 1925, Nr. 23), in welcher die Autoren teilweise zu ähnlichen Resultaten gelangen wie wir. Da sich unsere Arbeit auf ein großes Analysenmaterial stützt, haben wir von einer Kürzung Abstand genommen.

[3]) *E. St. Faust*, Schweiz. med. Wochenschr. 1925, Nr. 25.

sich im großen nicht bewährt habe. Nun hat unlängst *Faust* bekannt gegeben, daß das *Fränkel-Herrmann*sche Hormon dem Handelspräparat Sistomensin zugrunde liegt, und *Faust* hat auf die Identität des *Seitz-Wintz*schen Luteolipoids mit dem *Fränkel-Herrmann*schen Körper aufmerksam gemacht. Offenbar war es den amerikanischen Autoren entgangen, daß über die genannte Substanz in Europa schon eine 10jährige klinische Erfahrung vorliegt.

Zur Zeit der Einführung des Sistomensins war man für den pharmakologischen Nachweis auf den Wachstumstest angewiesen, welcher darin besteht, daß etwa vierwöchige Kaninchen mit der Substanz behandelt werden. Auf etwa sechs Injektionen im Verlauf von 1 bis 2 Wochen erfolgt ein geradezu phantastisches Wachstum des Uterus, welcher dem Volumen und dem Gewicht nach die 50fache Größe und darüber erreichen kann. Infolge des Tierverlustes und der langen Versuchsdauer hat diese Methode zweifellos gewisse Nachteile, und die amerikanische Methode ist als analytischer Fortschritt insofern sehr zu begrüßen, als sie in kurzer Zeit und ohne Tierverlust ausführbar ist. Sie ist jedoch durchaus nicht fehlerfrei. Es ist in Grenzfällen schwer zu entscheiden, ob eine positive Reaktion vorliegt. In dieser Beziehung ist ihr die Wachstumsprobe entschieden überlegen.

Nach unserer Ansicht erhält man ein sicheres Urteil nur durch parallele Anwendung beider Methoden, dies auch deshalb, weil wir vorläufig keinen Beweis dafür haben, daß die Oestrusreaktion streng spezifisch ist. Verschiedene Beobachtungen lassen uns vermuten, daß auch ohne Zufuhr von Hormon bei der kastrierten Ratte die Abstoßung von Schollenepithel vorkommen kann, eine Erscheinung, die wir als Brunst ansprechen.

Wir haben für unsere vorliegenden Untersuchungen auch deshalb davon abgesehen, zahlenmäßige Angaben über die Wirkungsstärke unserer Präparate zu geben. Der Ausdruck der Wirksamkeit in Ratteneinheiten erscheint uns nach unseren bisherigen Beobachtungen allzusehr von individueller Beobachtung und Schätzung abzuhängen, und wir haben als Hilfsmittel zur Auffindung der wirksamen Substanz uns damit begnügt, sowohl im Wachstumstest als in der Brunstreaktion stark positiven Ausfall beider Reaktionen als Wegweiser zu benutzen. Neben der Auffindung der wirksamen Substanz war ein Hauptzweck der vorliegenden Untersuchung auch der, wenn möglich festzustellen, ob die beiden Reaktionen durch denselben Stoff ausgelöst werden, oder ob es sich um das Vorkommen zweier verschiedener Hormone handelt. Das Vorkommen verschiedener wirksamer Stoffe wäre bei Organen mit so vielgestaltiger Funktion durchaus im Bereich der Möglichkeit gelegen. Um diese Frage zu entscheiden, ist es nötig, möglichst reines und einheitliches Material, womöglich in der Form eines chemischen

Individuums in der Hand zu haben. Ein großes Hemmnis in der Untersuchung der Hormone ist stets der Materialmangel. Die meisten bisherigen Untersucher hatten so geringe Substanzmengen in den Händen, daß sie nur physiologische Reaktionen ausführen konnten. Immerhin konnten schon frühere Untersucher zeigen, daß auch sorgfältig von Cholesterin befreite Extrakte die Brunstreaktion zeigen, daß selbst schonende chemische Angriffe ihre Wirkung nicht zerstören und daß die aktive Substanz hitzebeständig ist, was mit der früheren Erfahrung von *Fränkel* und *Herrmann* durchaus im Einklang steht.

Die Gesellschaft für chemische Industrie in Basel stellte uns ein großes Quantum getrockneter Organe zur Verfügung, so daß wir daran denken konnten, die aktive Substanz aus dem Rohextrakt zu isolieren. Wir verarbeiteten im ganzen mehrere hundert Kilogramme getrockneter Ovarien und Placenten und fußten bei der Aufarbeitung auf dem Pionierwerk von *Fränkel* und *Herrmann*, welche zum erstenmal zeigten, daß die Uteruswachstum erzeugende Substanz sich im Hochvakuum destillieren läßt, und daß sie stickstofffrei ist. *Herrmann*[1]) hat als prozentuale Zusammensetzung des wirksamen Destillats mitgeteilt:

C	. . . . .	81,33 bis 81,62	Proz.
H	. . . . .	11,32 „ 11,49	„

Fränkel und *Fonda*[2]) haben in einer späteren Publikation folgende Analysenzahlen für das wirksame Destillat mitgeteilt:

C	. . . . .	81,95	Proz.
H	. . . . .	11,21	„

und sie gaben als mögliche Formel $C_{32}H_{52}O_2$ an, wobei sie aber die Schwierigkeit der Aufstellung einer Formel betonen.

Es erschien uns vor allem wichtig, zunächst festzustellen, ob das Destillationsprodukt einheitlicher Natur sei. *Faust*[3]) hat unlängst einige Fortschritte auf dem Wege zur Isolierung des Reinhormons mitgeteilt. Wir werden im experimentellen Teile diese Methode eingehend beschreiben, erweitert durch neue Verfahren und Kunstgriffe. Um zukünftige Bearbeiter der Frage vor Enttäuschungen zu bewahren, möchten wir zu einer Wiederholung der Versuche nur dann raten, wenn genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung steht und wenn die technischen Voraussetzungen für die Aufarbeitung und für die Hochvakuumdestillation gegeben sind, sonst sind Mißerfolge nicht zu vermeiden.

Zur Darstellung destillierten Materials ist es nötig, ein weitgehend vorgereinigtes Produkt zu haben. Je mehr Ballast entfernt worden

---

[1]) Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. **41**, 1, 1915.
[2]) Diese Zeitschr. **141**, 379 bis 393, 1923.
[3]) Schweiz. med. Wochenschr. 1925, Nr. 25.

ist, desto leichter geht die Destillation. Das Vorreinigungsverfahren ist mühevoll und zeitraubend, aber für die glatte Abwicklung der Destillation nötig. Unser Verfahren besteht im folgenden. Wegen der Einzelheiten sei auf den experimentellen Teil verwiesen.

Die getrockneten, feinpulverisierten Organe (Ovarien- oder Placenten) werden mit einem Lösungsmittel, z. B. Benzol, erschöpfend extrahiert. Der nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibende Rohextrakt wird durch mehrere aufeinanderfolgende Operationen sukzessive gereinigt, wobei die Reihenfolge der Operationen abgeändert werden kann. Zweckmäßig werden die Reinigungsoperationen mehrmals wiederholt, nachdem es sich gezeigt hat, daß nach Entfernung von Verunreinigungen mit neuen Reinigungsmitteln auch mit dem bereits früher angewendeten Reinigungsmittel wiederum Fällung erzielt wird. Die Lipoide halten sich gegenseitig außerordentlich fest, und die Entfernung, z. B. der Fettsäuren, läßt sofort wieder andere Verunreinigungen frei werden, die vorher nicht oder nur schwer eliminierbar waren.

Folgendes sind die einzelnen Stufen:

Ausfällen der Phosphatide mit Aceton bei -10^0.

Entfernen der Fette durch Aufnehmen in Methylalkohol bei -10^0.

Ausfällen der Fettsäuren mit basischem Bleiacetat in Methylalkohol.

Entfernen der verbleibenden Fettsäuren durch Behandeln mit alkalisiertem Kohlenpulver in Aceton.

Ausfrieren in Aceton bei -70^0.

Nach dieser Methode erhält man schließlich ein helles rotgelbes Öl, das im Wachstumsversuch und im Brunstversuch stark positiv ist. Das Produkt soll sich in Petroläther klar auflösen und soll keine wesentlichen Mengen freier Fettsäuren enthalten. Auch ist es praktisch frei von Cholesterin. Falls das Präparat gut ausgefroren war, ist eine Entfernung des Cholesterins mit dem teuren Digitonin nicht mehr nötig. Dieses Material ist ein geeignetes Ausgangsprodukt für die Hochvakuumdestillation. Trotz seiner weitgehenden Reinigung stellt es noch erhebliche Anforderungen an die Destillierkunst. Namentlich zu Beginn der Destillation erfolgt oft lästiges Schäumen und Überspritzen, was das Destillieren zu einer wahren Geduldsprobe macht. Nicht unerwähnt möchten wir lassen, daß auch schon einmal destillierte Präparate nach kurzem Stehen an der Luft wiederum zum Schäumen neigen, und daß Unterbrechung der Destillation für die Fortsetzung verhängnisvoll sein kann, weil nachher endloses Steigen des Kolbeninhalts eintritt. Diese unangenehme Erscheinung steht zweifellos mit der Sauerstoffgierigkeit des Präparats im Zusammenhang. Es entstehen wahrscheinlich sehr leicht Oxydationsprodukte, die sich beim Destillieren in störender Weise bemerkbar machen. Die leichte Oxydier-

barkeit aller, auch der reinsten Hormonpräparate ist überhaupt unser ärgster Feind gewesen, und wir haben unsere Präparate stets unter möglichstem Luftabschluß unter Kohlensäure aufbewahrt. Aber selbst die unvermeidlichen Spuren Sauerstoff rufen stets mehr oder weniger rasch Braunfärbung der Präparate hervor; solche oxydierte Präparate sind nurmehr teilweise löslich in Petroläther, ein Teil wird unter Lackbildung zerstört.

Wir konnten nun die Destillation durch Anwendung eines Kunstgriffes zu einer einfachen Operation gestalten. Wenn man nämlich das zu destillierende Produkt mit Essigsäureanhydrid erwärmt, so läßt sich nach dem Entfernen des überschüssigen Essigsäureanhydrids das Hormon ohne Schwierigkeit destillieren wie andere Substanzen. Glaubten wir anfangs den Grund hierfür in der Entfernung der letzten Spuren Wasser suchen zu müssen, so erkannten wir bald, daß eine Acetylierung stattgefunden hatte. Die Acetylierung ändert jedoch weder an der Wirksamkeit noch am Siedepunkt irgend etwas. Ersteres war für uns sehr überraschend; es war das erstemal, daß wir ein wirksames Produkt in den Händen hatten, das eine recht eingreifende chemische Veränderung erlitten hatte, und wir hofften, daß in diesem ersten wirksamen Derivat eine einheitliche Reinsubstanz vorliege. Der unveränderte Siedepunkt konnte nicht überraschen, da die Siedepunkte im Hochvakuum so erniedrigt werden, daß unter normalem Druck weit auseinander liegende Siedepunkte nahe zusammenrücken. Das Acetylhormon ist ein helles, gelbliches, ziemlich leichtflüssiges Öl von merkwürdigem, nicht unangenehmem Geruch, das im absoluten Vakuum bei etwa 185° siedet. Man erhält es nach den niedriger siedenden Vorläufen als ziemlich konstant siedende und wohl abgegrenzte Fraktion. Der oben erwähnte Umstand, daß die Siedepunkte im Hochvakuum kein Kriterium für die Einheitlichkeit sind, veranlaßte uns, eine neue Fraktionierungsmethode zu versuchen, um an Hand von Analysen ersehen zu können, ob wir es mit einer einheitlichen Substanz zu tun haben. Zu diesem Zwecke konstruierten wir einen Mikroapparat, der es uns gestattete, ein Destillat in einzelne Tropfen zu zerlegen. Die abgefangenen Tropfen verbrannten wir nach *Pregls* Mikromethode. Aus der Untersuchung einer sehr großen Anzahl so gewonnener Mikrofraktionen ergab sich, daß die Analysenzahlen nicht weit voneinander abweichen, aber leider war die Übereinstimmung nicht so, daß sie uns die Berechnung einer Formel gestattet hätte. Als Zusammensetzung ergaben sich folgende Zahlen:

C	71,86	bis	73,42 Proz.
H	10,12	„	10,80 „

(Tabelle im experimentellen Teile).

Die weitere Bearbeitung hat uns dann auch bald gezeigt, warum eine völlige Einheitlichkeit nicht möglich ist.

Das Acetylhormon ist eine stark ungesättigte Substanz. Es entfärbt Permanganatlösung sofort und addiert reichlich Brom. Ein einheitliches Bromadditionsprodukt konnte nicht gefaßt werden. Die ungesättigte Natur geht auch aus der leichten Hydrierbarkeit hervor. Unter der Vermittlung von Platin oder Nickel nimmt es Wasserstoff auf, wobei es sich in eine farblose, wachsartige Masse verwandelt, die bei 45° schmilzt und sich aus Methylalkohol zum Teil kristallisiert erhalten läßt. Das Hydrohormon zeigte folgende Elementarzusammensetzung:

C	73,19 Proz.
H	11,86 „

Wie man sieht, ergeben die Analysen ein Bild, das mit den mittleren Fraktionen des nicht hydrierten Hormons übereinstimmt. Mit der Aufstellung einer Formel wollen wir jedoch vorsichtig sein und erst eine sicher einheitliche Substanz vor uns haben.

Nachdem uns die Molekulargewichtsbestimmungen nach der Camphermethode von *Rast* keine eindeutigen Resultate ergeben haben, hofften wir durch die Verseifung des Hormons Acetylzahlen zu erhalten, die uns einen tieferen Einblick in das Molekül gestatten würden. Jedoch wurden auch hier nach unserer Tropfenmethode keine völlig übereinstimmenden Resultate erhalten. Wir konnten aber feststellen, daß das Produkt tatsächlich gebundene Essigsäure enthält, im Mittel 8,58 Proz. Carboxyl in Form von Acetyl. Des weiteren wurde festgestellt, daß neben dem Essigsäurecarboxyl noch anderes nicht flüchtiges Carboxyl vorhanden ist. Es ergibt sich aus einer großen Reihe von Tropfenanalysen folgendes Durchschnittsbild:

Freies Carboxyl	1,18 Proz.
Gesamtcarboxyl	15,57 „
Essigsäurecarboxyl	8,58 „
Petrolätherlösliches Carboxyl	7,15 „

Dieses Ergebnis ließ uns vermuten, daß auf 1 Mol. Essigsäure 1 Mol. einer anderen, petrolätherlöslichen Säure vorhanden sei, und der weitere Schluß lag nahe, daß das Hormon ein Ester einer Fettsäure sei, der noch ein freies acetylierbares Hydroxyl aufweist. Es ließ sich an einen zweiwertigen Alkohol denken, welcher teilweise verestert wäre. Die Suche nach einem solchen zweiwertigen Alkohol hat aber bisher ein negatives Resultat ergeben, und die weitere Untersuchung der genannten Säure gab uns Aufschluß über die Bindungsart des Acetyls. Aus der

Verseifungslauge läßt sich eine ölige Säure abscheiden, die sich leicht im Vakuum destillieren läßt. Sie ergibt folgende Analysen im Mittelwert:

Carboxylgehalt	14,92 Proz.
C	76,64 „
H	11,60 „
Molekulargewicht	302,00

Die weitere Untersuchung ließ uns erkennen, daß es sich bei der Rohsäure um ein Gemisch handelt, das zum größten Teile aus den ungesättigten Fettsäuren C_{18} besteht. Hydrierung mit Platin ergab Stearinsäure. Oxydation mit Permanganat ergab eine Dioxystearinsäure neben anderen Oxyfettsäuren, wie Tetraoxystearinsäuren und Hexaoxystearinsäuren. Es müßten also im Hormon eine Reihe von Fettsäuren enthalten sein, wie Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. Die schon oben erwähnte Oxydierbarkeit läßt auch mit Sicherheit den Schluß zu, daß in den nichtdestillierten Hormonen auch Ester oxydierter Fettsäuren vorkommen, und das wiederum erklärt den günstigen Einfluß der Acetylierung auf die Destillation. Zweifellos haben wir es bei den Acetylhormonen mit Acetylderivaten solcher Oxysäuren zu tun.

Der Nachweis hoch ungesättigter Fettsäuren schließt sich auch den Befunden von *Cartland* und *Hart*[1]) an, welche im Acetonextrakt aus Corpus luteum die Anwesenheit großer Mengen hoch ungesättigter Fettsäuren nachgewiesen haben. *Cartland* und *Hart* haben die Säuren durch Verseifen des Gesamtacetonextrakts gewonnen, während wir die Vergesellschaftung dieser Säuren mit dem isolierten wirksamen Hormon als deren ständigen Begleiter feststellen konnten. Die Anhäufung dieser dem Lebertran und den Leinölfettsäuren nahestehenden Säuren ließ uns schon früher vermuten, daß das Hormon in naher genetischer Beziehung zu ihnen stehe und daß diesen Fettsäuren eine besondere biologische Rolle zufalle. Auch heute noch ist ein Zusammenhang nicht von der Hand zu weisen, wenn auch die Untersuchung gezeigt hat, daß die aus dem wirksamen Hormon abgespaltenen Fettsäuren völlig unwirksam sind. Es handelte sich also im weiteren darum, die zweite Hälfte des Hormons, den Neutralkörper zu suchen und, wenn möglich, rein darzustellen. Frühere Erfahrungen hatten uns gezeigt, daß bei der Verseifung unter den üblichen Bedingungen Vernichtung der Wirkung erfolgte. Offenbar hängt dies zusammen mit der leichten Oxydierbarkeit der Substanz, die durch die Gegenwart von Alkali noch gesteigert wird. Die stark ungesättigten Säuren vom Linolensäuretypus nehmen leicht Sauerstoff auf und übertragen ihn wahrscheinlich auch auf das für die Wirkung verantwortliche Bruch-

[1]) Journ. of biol. Chem. **66**, 619, 1925.

stück. Es war aber auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die zweite Hälfte überhaupt unwirksam sei, und daß das Hormon nur als Ester wirksam sei. Unsere Untersuchung hat ergeben, daß dies nicht der Fall ist, und daß der durch Verseifung entstehende Neutralkörper die volle Wirksamkeit besitzt. Verseift man nämlich unter Luftabschluß, so kann man ihn als helles, gelbliches, leichtflüssiges Öl gewinnen, das im Hochvakuum bei 145° siedet. Er erwies sich sowohl im Wachstumsversuch als auch im Brunstversuch als stark positiv. Der relativ niedrige Siedepunkt des Neutralkörpers ist insofern von Bedeutung, als er zeigt, daß die Substanz erst durch die Verseifung des bei 185° siedenden Hormons frei geworden sein muß. Es kann sich nicht um eine Beimengung gehandelt haben, da das bei 185° siedende Hormon von niedriger siedenden Vorläufen vollständig befreit war. Der Neutralkörper behält seine Wirksamkeit auch bei öfterem Destillieren unverändert. Er ist gegen Sauerstoff etwas weniger empfindlich als die Muttersubstanz, bräunt sich aber ebenfalls nach kurzer Zeit. Der Neutralkörper ergibt nach der Tropfenmethode fraktioniert folgende Analysenzahlen:

C	81,65	bis	82,00 Proz.
H	11,11	„	11,75 „

(siehe Tabelle im experimentellen Teile).

Wir wollen die Frage, ob hier eine einheitliche Substanz vorliegt, auf später vertagen und nur noch kurz erwähnen, daß auch diese Substanz ungesättigter Natur ist. Auffallend ist der geringe Sauerstoffgehalt. Er bestätigt auch die oben erwähnte Auffassung des Acetylprodukts, wonach das Acetyl an wohl sekundär bei der Aufarbeitung entstandenen Oxygruppen der Fettsäuren sitze und dadurch die ruhige Destillation ohne Störung durch Wasserabspaltung ermöglicht.

Da wir nun zur Destillation des Hormons zurückgekehrt sind, möchten wir noch einen weiteren auffallenden Befund mitteilen. Es hat sich gezeigt, daß der dickflüssige dunkle Destillationsrückstand noch wirksam war. Wir glaubten dies darauf zurückführen zu müssen, daß stets noch etwas aktives Material gelöst zurückbleibt und in den letzten Resten schwer auszutreiben sei. Wir gewannen auch stets aus den Rückständen durch einen nochmaligen Reinigungsprozeß noch geringe Mengen bei 185 bis 200° destillierbares Hormon. Die Rückstände von dieser zweiten Destillation haben wir nun, nachdem kein Tropfen mehr auszutreiben war, mit Gewalt zu destillieren versucht, und zu unserer Überraschung erhielten wir ohne wesentliche Zersetzung schöne Destillate bis zu einer Innentemperatur von 290°. Es ist bei solchen Temperaturen und im Hochvakuum nicht möglich, von Fraktionieren zu sprechen, immerhin müssen wir die vollständige

Abtrennung des bei 185° siedenden Hormons konstatieren. Die neuen, bei 240 bis 290° siedenden Destillate sind auch bedeutend dickflüssiger als die Hauptfraktion. Auch sie sind löslich in Olivenöl, und es zeigte sich im Tierversuch das auffallende Resultat, daß auch sie sowohl Wachstum als Brunst in typischer Weise hervorrufen.

Auch diese Destillate sind verseifbar, und es wird sich nun darum handeln, ob sie in ihren hohen Siedepunkt als Ester höherer Fettsäuren desselben Neutralkörpers besitzen, oder ob es sich um einen zweiten wirksamen Neutralkörper handelt. Untersuchungen hierüber sind im Gange. Schon heute wollen wir mitteilen, daß auch hier wiederum der Neutralkörper viel tiefer siedet als die Muttersubstanz, 200 bis 220° gegen 240 bis 290°, so daß wir auch hier eine esterartige Bindung annehmen dürfen. Wir konnten aber konstatieren, daß dieser Neutralkörper nicht einheitlicher Natur ist. Bereits ist es uns gelungen, daraus kristallisierte Substanzen abzuscheiden, die für die Wirkung jedoch nicht verantwortlich sind, und möglicherweise wird es gelingen, auch diese hochsiedenden Anteile auf den bei 145° siedenden aktiven Neutralkörper zurückzuführen, in dem Sinne, daß er den höheren Fraktionen beigemischt ist. Damit wäre auf chemischem Wege eine Annäherung an die Ansicht *Zondeks* gefunden, welcher unlängst auf Grund von Implantationsversuchen den Satz ausgesprochen hat, es gibt nur ein Ovarialhormon, das alle hormonalen Funktionen auslöst. Wir glauben, daß es noch verfrüht wäre, diese Ansicht vom chemischen Standpunkt aus als bewiesen zu betrachten. Ob es nicht eine ganze Gruppe von Ovarialhormonen gibt, können wir noch nicht mit Sicherheit behaupten. An ein Generationsorgan wie das Ovarium werden so verschiedene Anforderungen gestellt, daß wir annehmen dürfen, es seien nicht alle seine Funktionen auf ein und dieselbe Substanz zurückzuführen. Dafür sprechen auch die klinischen Erfahrungen mit dem *Seitz-Wintz*schen wasserlöslichen Ovarialpräparat Agomensin. Wohl aber dürfen wir an Hand unserer Versuche mit dem Neutralkörper 145° behaupten, daß eine Substanz, welche Uteruswachstum bewirkt, auch die Erscheinungen der Brunst auslöst. Ob mit diesen beiden Testen auch die klinische Wirkung parallel geht, ist eine Frage, die wir vorläufig nicht beantworten können. Der Beweis für eine solche Annahme könnte nur durch klinische Versuche mit dem isolierten Neutralkörper erbracht werden, Versuche, die vorläufig wegen der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz zurückgestellt werden müssen. Siehe auch *Brugsch* und *Rothmann*, Med. Klinik 1926, Nr. 8, S. 287, die als hauptsächlichen zur Bewertung dienenden Faktor die Stoffwechselsteigerung betrachten. Wir hoffen aber, daß unsere weiteren Versuche die Ausbeute an konstant zusammengesetzter Substanz so verbessern werden, daß es möglich sein werde, die klinische Prüfung durchzuführen. Wir

glauben deshalb auch, daß es kein dringendes Postulat ist, die Wirksamkeit der Ovarienpräparate in Ratten- oder Mäuseeinheiten zu deklarieren. Es wäre mehr zu begrüßen, wenn es gelingen würde, die wirksame Substanz auch technisch so zugänglich zu machen, daß sie gewichtsmäßig dosiert werden kann. Eine gewichtsmäßige Dosierung wäre unabhängig von den vielen Fehlerquellen, die bei der Standardisierung am Tiere unvermeidlich sind.

Wir möchten hier erwähnen, daß die Untersuchungen mit sehr geringen Substanzmengen durchgeführt werden mußten. Trotz der großen Quantitäten Ausgangsmaterialien erhielten wir nur wenige Gramm der wirksamen Fraktion 145°. Besonders mühevoll gestaltet sich das Arbeiten mit so geringen Mengen *flüssiger* Substanzen, die nicht kristallisieren. Die meisten der angewandten Methoden und Geräte mußten wir erst vom Makroverfahren auf Mikromethoden umarbeiten.

Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, daß es gelingt, durch ein neues Reinigungsverfahren und durch Vorbehandlung mit Essigsäureanhydrid das aktive Prinzip aus Ovarien und Placenten im Hochvakuum mit Leichtigkeit zu destillieren, was eine Verbesserung der Methode von *Fränkel* und *Herrmann* bedeutet.

Die erhaltene aktive Fraktion des Destillats zeigt annähernd konstante Zusammensetzung. Sie erwies sich als ein Gemisch von Estern höherer, stark ungesättigter Fettsäuren.

Durch Verseifen dieses wirksamen Estergemisches gelingt es, zu einem Neutralkörper zu gelangen, welcher bei 145° (0,02 mm) siedet und sowohl im Wachstumsversuch als im Brunstversuch sich als vollwirksam erwiesen hat. Die durchschnittliche Zusammensetzung dieser Substanz ist:

C . . . . . 81,83 Proz.
H . . . . . 11,43 „

Es konnte ferner gezeigt werden, daß eine Substanz, die Wachstum des jugendlichen Uterus erzeugt, auch befähigt ist, die künstliche Brunst hervorzurufen. Ob nur eine einzige solche Substanz vom Ovarium produziert wird, ist zur Zeit noch nicht mit Sicherheit festgestellt.

Experimenteller Teil.

1. Extraktion und Reinigung des Hormons.

Fein gemahlenes Placenta- oder Ovarienpulver wird mit einem Lösungsmittel, beispielsweise Benzol, erschöpfend extrahiert. Der nach dem Abdestillieren des Benzols verbleibende Rohextrakt wird im Hochvakuum bis auf 150 bis 160° Badtemperatur erhitzt, um das Phenol, das als Kon-

servierungsmittel gedient hatte, zu entfernen. Der phenolfreie Rückstand wird in Aceton aufgenommen und auf — 15° abgekühlt, wobei die Hauptmenge der Phosphatide entfernt wird. Das Filtrat von diesen Ausscheidungen wird bei — 15° mit alkalisierter Tierkohle behandelt, bis letztere nicht mehr neutralisiert wird und längere Zeit deutlich alkalisch bleibt. Die hierzu benötigte alkalisierte Tierkohle stellt man sich durch Imprägnieren von gewöhnlicher Tierkohle mit wässerig alkoholischer Natronlauge und Trocknen im Vakuum her (5 Proz. NaOH). Dadurch werden die freien Fettsäuren zum größten Teil als Seifen gefällt und von der Tierkohle nebst anderen Verunreinigungen adsorbiert. Das helle Filtrat wird eingedampft und in Methylalkohol aufgenommen. Bei — 15° fallen weitere ölige Verunreinigungen, Neutralfette, Cholesterin usw. aus. Durch Versetzen des Filtrats mit methylalkoholischer Lösung von Bleiacetat (dargestellt durch Kochen von Bleioxyd und Bleiacetat in Methylalkohol) erhält man abermals eine Fällung, die entfernt wird. Durch Aufnehmen in Petroläther und Versetzen mit essigsaurem Wasser wird das überschüssige Blei entfernt, wobei das Hormon in den Petroläther übergeht. Der Verdampfungsrückstand des Petroläthers wird, in Aceton gelöst, einem Tieftemperatur-Ausfrierverfahren unterworfen (Kohlensäureschnee-Aceton-Kältegemisch). Bei — 50 bis — 70° werden die letzten Beimengungen ausgeschieden; sie werden mit einer Tauchnutsche abfiltriert. Die einzelnen Verfahrensbestandteile können in verschiedener Reihenfolge angewendet werden. Sie werden so oft wiederholt, bis keine Fällungen mehr nach irgend einer Methode erzielt werden. Schließlich bleibt das Hormon als helles rotgelbes Öl zurück, das sich in tiefsiedendem Petroläther klar lösen soll und das nurmehr Spuren von Cholesterin enthält.

2. Destillation.

Das nach obigem Verfahren hergestellte Rohprodukt kann der Destillation unterworfen werden. Es neigt jedoch stark zum Schäumen und bereitet namentlich Ungeübten viel Verdruß, bis es gelingt, einmal ein Destillat zu erhalten. Besonders störend ist das Unterbrechen der Destillation zum Zurückgießen der übergespritzten Substanz, weil bei dieser Gelegenheit das heiße Hormon leicht Sauerstoff aufnimmt, wodurch die Destillation erst recht gestört wird. Es hat sich dann gezeigt, daß durch Acetylieren mit Essigsäureanhydrid das Rohhormon in ein Produkt verwandelt wird, das sich ohne jede Schwierigkeit destillieren läßt. Man erwärmt es zu diesem Zwecke am Wasserbad mit der dreifachen Menge Essigsäureanhydrid während einiger Stunden. Das überschüssige Essigsäureanhydrid wird hierauf im Vakuum abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum (0,02 bis 0,05 mm) fraktioniert. Hierzu verwendet man gewöhnliche Claisenkolben und als Vorlage eine der bekannten drehbaren Vorlagen mit verschiedenen Gefäßen. Man taucht den Kolben tief in das Bad, umwickelt die freien Stellen mit Asbest und beginnt langsam zu destillieren, damit die unwirksamen Vorläufe möglichst scharf abgetrennt werden. Schon unter 100° gehen ziemliche Mengen eines leichtflüssigen Öles über.

Bei etwa 150° (Außentemperatur 180°) verlangsamt sich die Destillation, um bei höheren Temperaturen (Bad 200°) sich wieder zu beschleunigen. Bei 170 bis 200° Innentemperatur geht die wirksame Hauptfraktion über, die später für sich gesondert refraktioniert wird. Die Vorläufe bis gegen 170° haben sich völlig unwirksam erwiesen, währenddem die Fraktion 170 bis 200° sowohl im Brunsttest als im Wachstumstest stark wirksam ist.

Bei weiterem Erhitzen (Außentemperatur bis 230°) hört die Destillation fast vollständig auf. Nach dem Erkalten im Hochvakuum wird der dickflüssige Rückstand in Methylalkohol aufgenommen. Hierbei bleibt ein dickes unansehnliches Öl ungelöst zurück. Die methylalkoholische Lösung wird wieder eingedampft und der Rückstand nochmals der Hochvakuumdestillation unterworfen, wobei man noch eine zweite kleinere Fraktion 170 bis 200° erhält, welche man mit der Hauptfraktion vereinigt. Der Rückstand von dieser zweiten Destillation beginnt bei Erhitzen auf noch höhere Außentemperatur erneut zu destillieren, und bei 240 bis 290° Innentemperatur geht ein dickes helles Öl über, das sich im Tierversuch ebenfalls noch als wirksam erwiesen hat.

Aus 50 kg Placentapulver wurden nach diesem Verfahren etwa 20 g der wirksamen Mittelfraktion erhalten. Dieselbe wurde nochmals fraktioniert, wobei wiederum eine kleine Menge Vorlauf abgetrennt wurde. Die Hauptmenge siedet beim zweiten Destillieren bei 185 bis 190° bei 0,02 mm und stellt ein helles, gelbliches Öl von starker Lichtbrechung dar. Der Geruch ist nicht unangenehm, er erinnert etwas an Lebertran.

Um die Frage der Einheitlichkeit dieses Produktes entscheiden zu können, versuchten wir dasselbe in möglichst kleine Fraktionen zu zerlegen, wozu uns nachstehend abgebildeter Fraktionierungsapparat diente.

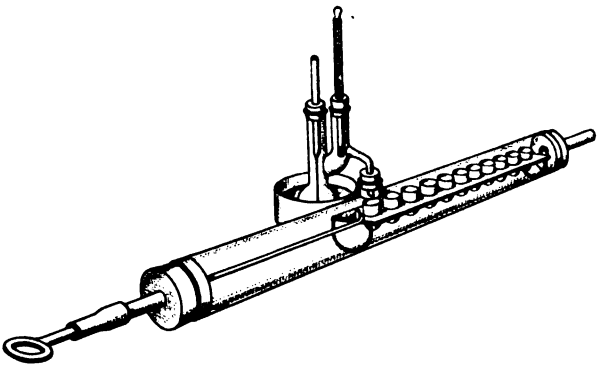


Abb. 1.

Zum Auffangen der Fraktionen dient ein Glasrohr, durch dessen oberen Tubus in der Mitte die Tropfen fallen. Durch den einen Stopfen des Glasrohres führt ein mit Vaselin gut abgedichteter Glasstab, an welchem ein Schlitten befestigt ist, welcher in Ausschnitten kleine Gläschen trägt, die durch Bewegen des Glasstabes nacheinander unter das Destillationsrohr geschoben werden können. Das freie Ende führt zur Pumpe. Diese Vorrichtung gestattet weit zahlreichere kleine Fraktionen zu entnehmen, als die bekannten drehbaren Vorlagen, welche nur für die Destillation größerer Quantitäten geeignet sind. Folgende Tabelle I gibt eine Übersicht über eine unserer zahlreichen Analysenreihen.

Wie man daraus ersieht, zeigen die einzelnen Tropfen keine solche Übereinstimmung, daß sich eine Formel errechnen lassen würde. Auch die Molekulargewichte nach der Camphermethode von *Rast* differieren erheblich voneinander.

Tabelle I.

Fraktion 185° (0.02 mm).

Destillationsreihe:

Fraktion:	I		II		III		IV		V		VI	
e	3,924	4,701	3,002	3,543	3,413	3,809	2,304	3,007	4,269	2,803	2,636	4,723
CO_2	10,560	12,602	8,025	9,512	9,161	10,173	6,101	7,937	11,278	7,378	6,943	12,456
H_2O	3,528	4,302	2,763	3,277	3,172	3,567	2,223	2,873	3,913	2,564	2,384	4,418
C . . . Proz.	73,42	73,13	72,93	73,24	73,22	72,86	72,24	72,01	72,07	71,81	71,86	71,95
H . . . „	10,06	10,24	10,30	10,35	10,40	10,48	10,80	10,69	10,26	10,24	10,12	10,47
e	10,20		8,40		10,24		9,875		5,641		17,78	
ε	102,5		87,07		106,4		102,6		59,88		189,3	
Δ	14,9		12,3		11,3		9,9		10,9		9,5	
Mol.-Gew.*) .	267		314		341		389		346		395	

*) Nach der Camphermethode von *Rast*.

Tabelle II.

Fraktionen	Gesamt-Carboxyl			Freies Carboxyl			Verseifbares Carboxyl	Petrolätherlösl. Carboxyl			Essigsäure-Carboxyl		
	Einw. mg	NaOH ccm	Proz.	Einw. mg	NaOH ccm	Proz.	Gesamt — freies = Proz.	Einw. mg	NaOH ccm	Proz.	Einw. mg	NaOH ccm	Proz.
I	21,93	3,18	14,49	18,90	0,26	1,35	14,49 — 1,35 = 13,14	22,94	1,59	6,92	19,75	1,60	8,31
II	19,84	2,96	14,92	21,18	0,28	1,32	14,92 — 1,32 = 13,60	13,11	0,93	7,09	—	—	—
III	14,45	2,19	15,14	20,89	0,24	1,14	15,14 — 1,14 = 14,00	21,25	1,52	7,17	22,07	1,88	8,55
IV	20,20	3,17	15,71	20,28	0,22	1,06	15,71 — 1,06 = 14,65	11,09	0,79	7,14	21,00	1,75	8,40
V	24,66	4,00	16,21	21,99	0,28	1,26	16,21 — 1,26 = 14,95	15,21	1,09	7,17	22,85	2,00	8,75
VI	24,16	4,09	16,94	15,30	0,15	0,97	16,94 — 0,97 = 15,97	14,65	1,08	7,39	21,75	1,94	8,92
	Mittel:		15,57	Mittel		1,18	Mittel: 14,38	Mittel:		7,15	Mittel:		8,58

3. *Verseifung des Hormons.*

Das destillierte Acetylhormon läßt sich mit alkoholischen Laugen leicht verseifen. Es wird mit titrierter äthylalkoholischer Alkalilauge am Wasserbad erwärmt und sofort mit $^1/_{48}$ HCl zurücktitriert. Sämtliche Verseifungen haben wir im kohlensäurefreien Wasserstoffstrom durchgeführt. Es wurde das Gesamtcarboxyl bestimmt, hernach wurde durch Ausziehen der angesäuerten Verseifungslauge mit Petroläther, Waschen der Petrolätherlösung mit Wasser und Titrieren des Petrolätherrückstandes das Fettsäurecarboxyl bestimmt, und endlich wurde das Acetyl bestimmt nach der Vorschrift von *Kögl* und *Postowsky* (Ann. **440**, 34).

Tabelle II gibt eine Übersicht über eine unserer Versuchsreihen.

Man ersieht aus der Tabelle II, daß annähernd gleiche Mengen Fettsäurecarboxyl und Essigsäurecarboxyl vorhanden sind. Da es sich aber um ein Gemisch verschiedener Substanzen handelt, so ist dieser Umstand ohne Bedeutung für die Konstitution. Die Verseifbarkeit des Hormons ließ auch noch die Vermutung aufkommen, daß es sich um ein Lacton handle. In diesem Falle hätte sich aus den Fettsäuren durch längeres Erhitzen wieder Wasser abspalten lassen sollen. Das petrolätherlösliche Produkt zeigt jedoch selbst bei mehrstündigem Erhitzen auf höhere Temperatur keine Abnahme des Carboxylgehalts, so daß wir das Vorliegen eines Lactons als ausgeschlossen betrachten können.

4. *Analysen der Hormonsäuren.*

Zur Gewinnung der Hormonsäuren wurde die Fraktion 185° in Methylalkohol mit pulverisiertem Barythydrat in einer Wasserstoffatmosphäre gekocht. Nach 3 Stunden wird der Methylalkohol abdestilliert, der Rückstand wird zur Entfernung der Neutralkörper mehrmals mit Aceton ausgezogen und hierauf werden die Bariumsalze mit verdünnter Salzsäure am Wasserbad zersetzt. Die frei gewordenen Säuren werden mit Petroläther extrahiert. Der Petroläther wird nach Waschen mit wenig Wasser abdestilliert und der Rückstand im Vakuum bei 110° getrocknet. Er wurde in einem Mikrovakuumdestillierkölbchen nach *Pregl* destilliert und das Destillat ergab folgende Analysenzahlen:

Carboxylgehalt	15,06 Proz.
C	76,57 „
H	11,6 „
Molekulargewicht	302

Diese Zahlen würden einer Formel C 19,3, H 35,0, O 2,2 entsprechen. Offenbar handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Säuren.

5. *Katalytische Hydrierung der Hormonsäuren.*

50 bis 80 mg Hormonsäure werden in 10 ccm Eisessig gelöst und mit 10 bis 20 Proz. *Willstätter*schem Platinschwarz in einer kleinen Schüttelbirne mit Wasserstoff behandelt. Als Meßgefäß für den Wasserstoff dient eine in Zehntelkubikzentimeter eingeteilte Bürette. Nach 7 bis 8 Stunden war die Wasserstoffaufnahme beendigt. Der von Platinschwarz befreite Eisessig wird im Vakuum abdestilliert; der Rückstand erstarrt beim Abkühlen und wird aus Methylalkohol umkristallisiert. Er besteht zu einem wesentlichen Teil aus Stearinsäure, was sich aus der Analyse und durch Mischschmelzpunkt ergibt.

Aus der Wasserstoffaufnahme läßt sich entnehmen, daß zwei bis drei Doppelbindungen vorhanden sein müssen. Zum Beispiel verbrauchten 83,2 mg Hormonsäure 16,4 ccm Wasserstoff. Berechnet für zwei Doppelbindungen 11,8 ccm, für drei Doppelbindungen 17,8 ccm. Es liegt also ein Gemisch von Säuren mit zwei, drei, vielleicht vier Doppelbindungen vor.

6. Oxydation der Hormonsäuren.

Die wässerige Lösung der hormonsauren Kalisalze lieferte bei der Oxydation mit 1,5proz. Kaliumpermanganatlösung in der Kälte eine ganze Reihe von Oxysäuren. Unter anderem eine Dioxystearinsäure vom Schmelzpunkt 63 bis 64°, während die gewöhnliche Dioxystearinsäure den Schmelzpunkt 137° hat.

Analyse der Dioxystearinsäure vom Schmelzpunkt 63 bis 64°.

Carboxylgehalt . .	gef. 14,02 Proz.	ber. 14,24 Proz.
C	„ 68,44 „	„ 68,29 „
H	„ 11,39 „	„ 11,48 „
Molekulargewicht .	320	316

Auch die Sativinsäure (Tetraoxystearinsäure) und die Linusinsäure (Hexaoxystearinsäure) konnten abgeschieden und identifiziert werden.

7. Hydrierung des unverseiften Hormons.

Wie die freien Fettsäuren, läßt sich auch das intakte Hormon mit Platin oder Nickel hydrieren. 1 g Substanz nimmt z. B. 96,5 ccm Wasserstoff auf. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels läßt sich das Hydrierungsprodukt im Hochvakuum destillieren. Es siedet bei 175 bis 185° (0,05 mm), Ölbad 200 bis 220°. Das Destillat bildet eine wachsartige Masse, die sich aus heißem Methylalkohol zum Teil kristallisiert erhalten läßt. Beim Verseifen des kristallisierten Produktes konnten wiederum feste Fettsäuren erhalten werden, die zum größten Teil aus Stearinsäure bestehen. Das kristallisierte Produkt ergab folgende Analysenzahlen.

Tabelle III.

C Proz.	H Proz.	Freies Carboxyl Proz.	Gesamt-Carboxyl Proz.	Verseifbares Carboxyl Proz.	Petroläther-lösliches Carboxyl Proz.	Wasserlösliches Carboxyl (Essigsäure) Proz.
73,19	11,78	1,154	19,35	18,20	8,10	8,27
73,15	11,86	1,145	19,34	18,20	8,12	

Die Mutterlaugen des kristallisierten Hydrohormons enthalten einen zweiten Körper, der erst in der Kältemischung erstarrt. Auch dieser Umstand zeigt, daß das destillierte Hormon nicht einheitlicher Natur ist.

8. Nachweis der Essigsäure im ursprünglichen wie auch im hydrierten Hormon.

Sowohl das ursprüngliche wie auch das hydrierte Hormon wurde mit alkoholischer Kalilauge verseift. Nach dem Ansäuern der Salzsäure werden die Fettsäuren mit Petroläther entfernt, die wässerige Lösung wird schwach alkalisch gemacht und zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wird mit konzentrierter Phosphorsäure angesäuert und mit absolutem

Äther extrahiert. In der ätherischen Lösung konnte mit Leichtigkeit Essigsäure nachgewiesen werden durch Überführung in Acetanilid. Schmelzpunkt 113 bis 114°.

9. Der Neutralkörper.

Verseift man das Hormon vom Siedepunkt 185° beispielsweise mit Baryt in Methylalkohol, so erhält man den Neutralkörper durch Fällen der fettsauren Salze mit Aceton. Nach dem Abdestillieren des Acetons nimmt man den Rückstand in Petroläther auf und wäscht die petrolätherische Lösung mit wenig Wasser. Nach dem Trocknen wird der Petroläther verdampft und der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Es geht ein helles, ziemlich leichtflüssiges, in der Hauptsache bei 144° siedendes Öl über. Durch mehrmaliges Refraktionieren wird das Produkt als ein bei 145° siedendes anscheinend einheitliches Öl erhalten. Auch dieser Körper wurde nach der Tropfenmethode in Fraktionen zerlegt, wobei sich eine gute Übereinstimmung der Analysenzahlen ergab. So werden z. B. erhalten:

C	82,00 Proz.,	81,96 Proz.,	81,65 Proz.
H	11,17 ,,	11,28 ,,	11,75 ,,

Der niedriger siedende Neutralkörper wird aus sorgfältig von Vorläufen befreitem Hormon erhalten, er muß uns also bei der Verseifung neu entstanden sein.

Auch der Neutralkörper ist in Wasser unlöslich und leicht löslich in organischen Lösungsmitteln. Er ist wie das unverseifte Hormon sauerstoffempfindlich und bräunt sich an der Luft, wenn auch nicht so schnell wie das Ausgangsmaterial. Die Substanz erwies sich in einer größeren Reihe von Tierversuchen als stark positiv im Wachstumsversuch und in der Brunstreaktion. Quantitative Vergleiche mußten wir unterlassen, da wir lediglich auf Reinsubstanz und nicht auf Wirkungsausbeute gearbeitet haben.

Wir möchten noch erwähnen, daß wir trotz eifrigen Suchens nie Glycerin als Spaltungsprodukt bei der Verseifung auffanden.

Die weitere Untersuchung des Neutralkörpers ist im Gange, und wir hoffen, darüber später Näheres mitteilen zu können.

Für die Prüfung der zahlreichen Substanzen im Tierversuch sprechen wir Herrn Privatdozent Dr. *Fritz Uhlmann* in Basel unseren besten Dank aus.

Über den Einfluß der Fütterung mit aktivem und inaktivem Eisenoxyd auf den Harnquotienten C:N beim Kaninchen.

Von

Hideo Wada (Osaka).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 31. Mai 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In ihrer Arbeit „Chemische und physikalische Studien zum Mineral-, insbesondere zum Eisenstoffwechsel“[1]) teilen *Baudisch* und *Welo* folgende Beobachtungen mit.

Sie stellten ein magnetisches Eisenoxyd „Magnetit“ ($FeO Fe_2O_3$) künstlich her, oxydierten es bei 300° C im Sauerstoffstrom und erhielten dabei ein wasserfreies, rostbraunes Pulver mit noch stärkerer magnetischer Kraft. Dieses Pulver war Eisenoxyd Fe_2O_3. Bei weiterer Erhitzung auf 500° C ging dieses stark magnetische Eisenoxyd in ein unmagnetisches Eisenoxyd von derselben chemischen Formel Fe_2O_3 über. Die Röntgen-Interferenzphotographie zeigte, daß das Molekül der ersten Oxydationsstufe, nämlich das magnetische Eisenoxyd, kubische, das der zweiten Oxydationsstufe, das unmagnetische Eisenoxyd, rhomboedrische Kristallstruktur hatte. Diese physikalisch verschieden strukturierten Stufen des Eisenoxyds nennen diese Autoren „allotrope Formen im atomaren Aufbau des Eisenoxyds“.

Es zeigte sich weiter, daß Zusatz von dem magnetischen Eisenoxyd zum Nährboden gewisser Bakterien deren Wachstum begünstigt, während Zusatz von dem unmagnetischen Eisenoxyd keinen derartigen Einfluß erkennen läßt. Aus diesem Grunde wird das stark magnetische Eisenoxyd „aktives“, das unmagnetische Eisenoxyd „inaktives“ Eisenoxyd genannt. Biologisch aktives Eisenoxyd absorbiert sehr wenig Wasser, biologisch inaktives Eisenoxyd aber absorbiert viel Wasser. *Erich Müller* hat dann in seinem Bericht neuer Forschungsergebnisse über die Wirkung von Mineralstoffverbindungen[2]) die allgemeine physiologische Bedeutung dieser

---

[1]) Die Naturwissenschaften, Jahrg. 13, 1925, Heft 36. Berlin, Julius Springer.

[2]) Arch. f. Kinderheilk. 77.

Befunde von *Baudisch* und *Welo*, insbesondere ihre Beziehung zum Vitaminproblem gewürdigt.

Auf Veranlassung von Professor *Bickel* habe ich nun die Stoffwechselwirkung dieser beiden Eisenoxyde an Kaninchen studiert, und zwar an dem Verhalten des Harnquotienten C : N. Abgesehen von den von *Warburg* nachgewiesenen Beziehungen des Eisens zur Atmung und von den Beobachtungen *Abderhaldens* über den das Wachstum fördernden Einfluß des Eisens liegt kaum experimentelles Material über allgemeine Stoffwechselwirkungen des Eisens in der Literatur vor. Es war zu erwarten, daß das aktive Eisenoxyd starke Wirkungen im intermediären Stoffwechsel ausüben mußte, die dem inaktiven Eisenoxyd fehlten, oder die bei ihm nur in geringfügigem Maße vorhanden waren. Die Richtigkeit dieser Vermutung wurde durch meine Experimente an Kaninchen vollauf bestätigt. Die Wirkung des aktiven Eisenoxyds auf den Harnquotienten C : N war eine geradezu frappante; bei dem inaktiven Eisenoxyd wurde während der Medikation überhaupt kein Einfluß auf den Quotienten gesehen, eine geringfügige Spätwirkung war aber wohl vorhanden.

Professor *Bickel* ist der Meinung, daß durch diese Versuche der Eisentherapie in der Klinik wahrscheinlich ein erweitertes Wirkungsfeld erschlossen werden könnte, wenn man sich des aktiven Eisenoxyds bedient.

Bei der Gabe des aktiven Eisenoxyds steigt der Harnquotient C : N gewaltig an. Ein derartiger Anstieg unter der Einwirkung von Arzneimitteln ist bisher nur bei der Gabe eines Hypophysenpräparats (Hypophysin) von uns beobachtet worden. Ich habe diesbezügliche Versuche in meiner Arbeit „Über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei Fütterung von Schilddrüsen- und Hypophysenpräparaten“[1]) veröffentlicht. Da die Quotientsteigerung vor allem durch eine N-Spaltung in beiden Fällen zustande kommt, scheint die Quotientsteigerung einen Einfluß auszudrücken, den das aktive Eisenoxyd und wohl auch das Hypophysin auf die assimilatorische Phase des Stoffwechsels hat. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Hypophysin kein Vorderlappenpräparat ist, also nicht dem Wachstumsorgan der Hypophyse entstammt.

Die allgemeine und prinzipielle Bedeutung meiner Versuche, wie derjenigen von *Baudisch* und *Welo* für die Abhängigkeit der biologischen Wirkung von Mineralstoffen von der feineren Art ihrer Atomstruktur, soweit diese nicht den chemischen Charakter des betreffenden Atoms allein bedingt, liegt auf der Hand.

---

[1]) Diese Zeitschr. 174, 392, 1926.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Zwei Kaninchen von 1900 bzw. 1600 g Körpergewicht wurden bei gleichmäßiger Fütterung mit Futterrüben gehalten. In einer fünftägigen Vorperiode wurde die tägliche Lage des Harnquotienten C : N durch Analyse der 24stündigen Harnmenge auf C und N bestimmt und daraus die Lage des Quotienten im Periodendurchschnitt berechnet. Darauf erhielt jedes Tier täglich 5 mg bzw. 4 mg aktives Eisenoxyd in Form einer Aufschwemmung in etwa 30 ccm Wasser durch die Sonde in den Magen gegossen. Das wurde 5 Tage lang gemacht. Wieder wurde in dieser ersten Hauptperiode die Lage des Quotienten ermittelt. Alsdann folgte eine Zwischenperiode von 11 bzw. 10 Tagen, in der die Tiere lediglich ihre Futterrübennahrung wie in der Vorperiode erhielten. Die Quotientbestimmung wurde weiter gemacht. Nunmehr bekam jedes Tier in einer zweiten Hauptperiode täglich 5 bzw. 4 mg inaktives Eisenoxyd in Aufschwemmung in etwa 30 ccm Wasser durch die Sonde per os als Zulage zur Nahrung Es folgte dann eine neun- bzw. achttägige Nachperiode, in der nur das Futter wie in der Vor- und Zwischenperiode den Tieren ohne Eisenzulage verabfolgt wurde. Auch in der zweiten Hauptperiode und in der Nachperiode wurde der Quotient bestimmt.

Beide Versuche hatten ein völlig übereinstimmendes Ergebnis. Unter dem Eindruck der Gabe des aktiven Eisenoxyds stieg der Quotient gewaltig an. Schon am ersten Tage der Medikation war der Anstieg vorhanden. Nach Aussetzen der Gabe dieses Präparats blieb der Quotient noch mehrere Tage (6 bis 4 Tage) hoch und sank dann in den letzten 5 bis 6 Tagen dieser Zwischenperiode ein wenig unter den Wert der Vorperiode. Der Durchschnittsquotient in dieser ganzen Zwischenperiode war natürlich ebenfalls beträchtlich niedriger als der Quotient in der ersten Hauptperiode.

Als nun in der zweiten Hauptperiode das inaktive Eisenoxyd gegeben wurde, sank der Quotient im Vergleich zu dem Durchschnittsquotienten der ganzen Zwischenperiode, stieg aber bei dem Kaninchen I ein wenig und sank bei dem Kaninchen II eine Spur gegenüber dem Werte, den der Quotient in den letzten Tagen der Zwischenperiode gehabt hatte. Es war also durch die Medikation des inaktiven Eisenoxyds praktisch keine Quotientänderung zustande gekommen. In der nun folgenden Nachperiode hob sich bei beiden Kaninchen der Quotient etwas über den Wert der zweiten Hauptperiode und auch über den Wert der Vorperiode.

Vielleicht haben wir es hierbei mit einer Spätwirkung des inaktiven Eisens zu tun, denn gegen Ende der Nachperiode lag der Quotient durchschnittlich etwas tiefer als zu Beginn derselben.

Aus allen diesen Versuchen ergibt sich, daß die Gabe des aktiven Eisenoxyds eine starke Quotientsteigerung hervorruft, die sofort auftritt und die auch noch einige Tage nach Aussetzen der Medikation bestehen bleibt, während das inaktive Eisenoxyd während seiner Medikation praktisch gar keinen Einfluß auf die Lage des Quotienten hat, höchstens aber eine Nachwirkung im Sinne einer geringfügigen Quotienterhöhung erkennen läßt.

Die durch das aktive Eisenoxyd bewirkte Quotienterhöhung kommt vor allem durch eine N-Sparung zustande; denn der Harn wird ärmer an N. Die Kohlenstoffausscheidung durch den Harn war in dem einen Falle (Kaninchen I) dabei unverändert, in dem anderen Falle (Kaninchen II) leicht erhöht.

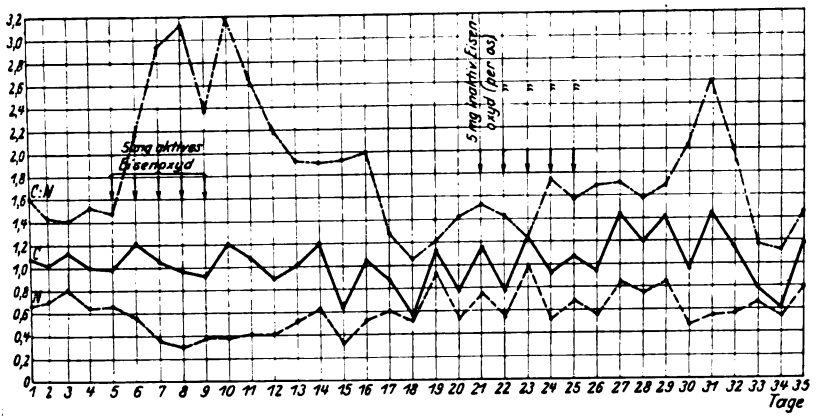


Abb. 1. Kaninchen I.

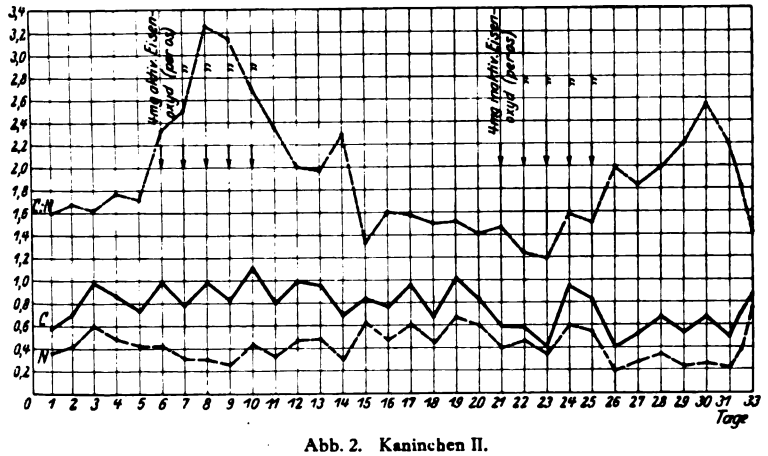


Abb. 2. Kaninchen II.

Bei der Gabe des inaktiven Eisenoxyds war die geringfügige Nachwirkung im Sinne einer leichten Quotienterhöhung durch entsprechende Veränderungen am C und N zustande gekommen.

Es muß vorläufig dahingestellt bleiben, ob die Verschiedenheit in der Wirkung der beiden Eisenoxyde auf Verschiedenheiten in der Resorption oder der cellulären Wirkung besteht.

Experimenteller Teil.

Der N wurde nach *Kjeldahl*, der C nach der in der Arbeit von *Gomez*[1]) beschriebenen Methode bestimmt. Alle Analysen wurden doppelt ausgeführt.

[1]) Diese Zeitschr. **167**, 424, 1926.

Versuchsprotokolle.

Kaninchen I.

Datum	Körpergewicht g	Harn ccm	C g			N g			C : N			Bemerkungen
20. III.	1950	300	1,088 10	(1,046 05)		0,6720	(0,700 14)		1,619	1,4974		
21. III.	1950	315	1,020 60			0,7056			1,446			
22. III.	1920	320	1,138 88			0,8064			1,411			
23. III.	1900	360	1,003 32			0,6552			1,531			
24. III.	1900	315	0,979 34			0,6615			1,480			
25. III.	1920	400	1,212 00	(1,069 65)		0,5600	(0,3979)		2,164	2,758		5 mg aktives Eisenoxyd (per os)
26. III.	1920	320	1,054 08			0,3584			2,941			
27. III.	1950	220	0,961 18			0,3080			3,120			
28. III.	2020	275	0,914 92			0,3850			2,376			
29. III.	2000	270	1,206 09			0,3780			3,190			
30. III.	2020	365	1,077 11	0,972 97	0,938 73	0,4066	0,4679	0,5601	2,649	2,101	1,7385	
31. III.	1900	290	0,895 23			0,4060			2,205			
1. IV.	1920	370	0,999 00			0,5180			1,928			
2. IV.	1950	320	1,197 44			0,6272			1,909			
3. IV.	2000	160	0,621 92			0,3240			1,919			
4. IV.	1900	380	1,047 16			0,5256			1,999			
5. IV.	1950	360	0,875 88	0,897 64		0,6048	0,6707		1,283	1,301		
6. IV.	1920	155	0,550 40			0,5208			1,056			
7. IV.	1970	370	1,129 98			0,9324			1,212			
8. IV.	1970	355	0,779 58			0,5467			1,426			
9. IV.	1900	535	1,152 39			0,7490			1,538			
10. IV.	1950	300	0,777 30	0,994 56		0,5460	0,6631		1,423	1,5376		5 mg inaktives Eisenoxyd (per os)
11. IV.	1950	445	1,243 77			0,9968			1,247			
12. IV.	2000	380	0,920 36			0,5256			1,751			
13. IV.	1930	540	1,071 90			0,6804			1,575			
14. IV.	1920	450	0,959 50			0,5670			1,692			
15. IV.	2000	500	1,442 50	1,130 88		0,8400	0,6714		1,717	1,713		
16. IV.	1950	106	—			—			—			
17. IV.	2000	420	1,207 08			0,7644			1,577			
18. IV.	2100	600	1,417 08			0,8400			1,687			
19. IV.	2000	550	0,953 97			0,4620			2,064			
20. IV.	2000	660	1,446 72			0,5544			2,609			
21. IV.	2000	680	1,138 66			0,5712			1,993			
22. IV.	1980	590	0,785 29			0,6608			1,188			
23. IV.	2020	485	0,613 72			0,5432			1,129			
24. IV.	2000	640	1,172 92			0,8064			1,454			

Kaninchen II.

Datum	Körpergewicht g	Harn ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
10. IV.	1600	200	0,581 40		0,364		1,597		
11. IV.	1550	300	0,702 90		0,420		1,673		
12. IV.	1550	435	0,988 32	0,774 85	0,609	0,462	1,623	1,6724	
13. IV.	1600	350	0,868 70		0,490		1,773		
14. IV.	1620	305	0,732 92		0,427		1,716		
15. IV.	1620	340	0,996 88		0,4284		2,327		4 mg aktives Eisenoxyd (per os)
16. IV.	1600	220	0,788 98		0,3160		2,496		
17. IV.	1600	435	0,989 41	0,953 38	0,3045	0,3487	3,249	2,7828	
18. IV.	1600	375	0,824 66		0,2625		3,141		
19. IV.	1620	380	1,166 98		0,4320		2,701		
20. IV.	1550	400	0,792 00		0,3360		2,357		
21. IV.	1600	340	0,980 11	0,855 25	0,4760	0,3993	2,059	2,171	
22. IV.	1600	430	0,952 23		0,4816		1,977		
23. IV.	1550	310	0,696 66		0,3038		2,293		
24. IV.	1550	445	0,832 59		0,6230		1,336		
25. IV.	1620	425	0,760 32	0,845 73	0,4760	0,570 03	1,597	1,488	
26. IV.	1600	270	0,951 37		0,6048		1,573		
27. IV.	1600	400	0,674 16		0,4480		1,504		
28. IV.	1650	370	1,019 16		0,6734		1,513		
29. IV.	1600	425	0,836 82		0,5950		1,406		
30. IV.	1620	360	0,588 96		0,4032		1,461		4 mg inaktives Eisenoxyd (per os)
1. V.	1630	550	0,576 02	0,671 72	0,4620	0,4726	1,246	1,3974	
2. V.	1580	310	0,414 16		0,3472		1,192		
3. V.	1600	360	0,956 16		0,6048		1,581		
4. V.	1620	390	0,823 29		0,5460		1,507		
5. V.	1600	240	0,401 76		0,2016		1,992		
6. V.	1720	205	0,527 77		0,2870		1,838		
7. V.	1720	305	0,677 10		0,3416		1,982		
8. V.	1720	290	0,537 66	0,635 19	0,2436	0,3379	2,207	1,963	
9. V.	1700	235	0,671 63		0,2632		2,551		
10. V.	1720	160	0,492 16		0,2240		2,197		
11. V.	1720	345	0,705 59		0,3864		1,826		
12. V.	1750	450	1,067 85		0,7560		1,412		

0,849 542 | 0,501 76 | 1,7615

Über den Mechanismus der Blausäurehemmung von Atmungsmodellen.

Von

Hermann Blaschko.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 2. Juni 1926.)

Die Analogie zwischen der spezifischen Blausäurewirkung auf Eisenkatalysen und auf die Zellatmung ist einer der Gründe zur Aufstellung der *Warburg*schen Atmungstheorie gewesen, die den Schwermetallen, insbesondere dem Eisen, die Rolle als Sauerstoffüberträger in der Zelle bei der Oxydation der Nährstoffmoleküle zuweist. Danach erklärt sich die Vergiftung der Atmung durch kleine Mengen Blausäure dadurch, daß das Metall mit der CN-Gruppe eine Komplexverbindung eingeht, die katalytisch unwirksam ist.

Nun aber sind im allgemeinen die Komplexverbindungen der Schwermetalle, insbesondere des Eisens, mit Blausäure stabil, so daß man die Blausäure aus ihnen nicht mit einfachen physikalischen Mitteln entfernen kann und das Eisen als Ion wiedergewinnt, während auf der anderen Seite die Blausäurevergiftung der Zellatmung vollständig reversibel ist, indem schon durch Auswaschen der Zellen, Auspumpen der Lösung usw. die Zelloxydation wieder auf die ursprüngliche Höhe gelangt. Wir müssen daher annehmen, daß es sich um andere Verbindungen handelt, als etwa die nach Art der Ferrocyanwasserstoffsäure aufgebauten. Die Metallblausäureverbindungen müssen wohl analog denen des Hämoglobins mit Sauerstoff und mit Kohlenoxyd gedacht werden, die ja auch durch Herabsetzung des Partialdruckes der betreffenden Gase zerlegt werden.

Für den Biologen steht die Frage nach der Konstitution dieser Verbindungen nicht so sehr im Vordergrund; es interessiert mehr, ob die katalytischen Prozesse der unbelebten Natur, die spezifisch blausäureempfindlich sind, in ähnlicher Weise nach der Entfernung der Blausäure aus der umgebenden Lösung ihre katalytische Fähigkeit

wiedergewinnen, wie die vergifteten Zellen[1]). Hierauf waren die verschiedenen Atmungsmodelle zu untersuchen, die im Laufe der letzten Jahre beschrieben wurden. Es ist dies an erster Stelle in Wasser aufgeschwemmte Tierkohle, an der die Aminosäuren in ähnlicher Weise oxydiert werden wie in der Zelle[2]), eine Oxydation, die auf das in der Oberfläche der Kohle komplex gebundene Eisen zu beziehen ist[3]), ferner das seit langem bekannte Palladiummohr, das Alkohol zu Essigsäure oxydiert sowie Wasserstoffsuperoxyd zersetzt wie die tierische Katalase. Auf der anderen Seite aber gibt es homogene Katalysen, die auch Paradigmata für bestimmte vitale Oxydationen liefern: insbesondere die Oxydation von Fructose in konzentrierter Phosphatlösung[4]), die ebenfalls auf Metallspuren zurückzuführen ist[5]), ferner die Übertragung des Sauerstoffs auf ungesättigte Fettsäuren durch Sulfhydrilverbindungen, insbesondere Cystein[6]), die ihrerseits auf der durch Eisenspuren bedingten Spontanoxydation des Cysteins beruht[7]), also letzten Endes auch eine Metallkatalyse ist.

Von diesen Modellen habe ich auf Veranlassung von Herrn *Meyerhof* die erstgenannten heterogenen Katalysen und als Beispiel einer homogenen Katalyse die Oxydation der Fructose auf Reversibilität der Blausäurewirkung untersucht. Inzwischen zeigten *Warburg* und *Toda*[8]), daß die Oxydation von Oxalsäure durch Jodsäure in schwefelsaurer Lösung durch Blausäure vergiftet und diese Vergiftung durch bloßes Luftdurchleiten rückgängig gemacht werden kann. Ferner machte *Wertheimer*[9]) die Angabe, daß die Blausäurevergiftung der Indophenolblausynthese zurückgeht, wenn die blausäurehaltige Lösung verdünnt wird[10]).

I. Die Aminosäureoxydation an Kohle.

Die Oxydation von Aminosäuren an Kohle, die von *Warburg* und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht worden ist, weist so viele Analogien mit der Zellatmung auf, daß die Frage der Reversibilität der Blausäurevergiftung hier von besonderem Interesse war.

---

[1]) Ebenso wie die Vergiftung der Zellen ist auch die der Fermente reversibel; s. z. B. *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 309, 1905.

[2]) *O. Warburg* und *Negelein*, diese Zeitschr. **113**, 257, 1921.

[3]) *O. Warburg*, ebendaselbst **119**, 134, 1921.

[4]) *Warburg* und *Yabusoe*, ebendaselbst **146**, 380, 1924.

[5]) *O. Meyerhof* und *K. Matsuoka*, ebendaselbst **150**, 1, 1924; *Wind*, ebendaselbst **159**, 58, 1925.

[6]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **199**, 531, 1923.

[7]) *O. Warburg* und *Sakuma*, ebendaselbst **200**, 203, 1923.

[8]) Naturwissensch., Jahrg. 13, Heft 20, S. 442, 1925.

[9]) Fermentforschung 8, 497, 1925.

[10]) Siehe auch *Wieland*, Ann. **445**, 181, 1925.

Methodisches.

Benutzt wurde Carbo medicinalis *Merck*, biologisch hochwertig, in jedem Versuch 0,1 g. Die zum Versuch dienende Kohle wurde alle paar Tage einige Minuten geglüht, wodurch die Wirksamkeit stark stieg. Als Aminosäure diente Leucin (synthetisch) in n/20 Lösung. Die Kohle wurde in 8 ccm Flüssigkeit suspendiert. Die Atmungströge, von der von *Tanaka* abgebildeten Form, mit einem Rauminhalt von etwa 25 ccm, wurden mit Sauerstoff gefüllt. Gemessen wurde der verbrauchte Sauerstoff. Im Einsatz befand sich keine Kalilauge, da sonst durch die Überdestillation der Blausäure in den Einsatz sowohl die Konzentration der HCN in der Versuchslösung sinkt, als auch bei höheren HCN-Konzentrationen Fehler bei der Messung entstehen können. Die verbrauchte Sauerstoffmenge berechnet sich dann aus der abgelesenen Höhendifferenz nach der von *Warburg*[1]) abgeleiteten Formel:

$$X_{O_2} = h \left[\frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma \cdot K_{O_2}} \right]$$

γ, der respiratorische Quotient der Leucinoxydation, ist von *Warburg* und *Negelein*[2]) zu 0,8 bestimmt worden. Da die geglühte Kohle eine gewisse Selbstoxydation zeigt, ist diese in den unten angeführten Versuchen bereits in Abzug gebracht worden. Diese Autoxydation ist durch Blausäure nicht hemmbar, ist also in allen Versuchen gleich groß.

Die Versuche wurden folgendermaßen angestellt: Zuerst wurde die Oxydation des Leucins mit und ohne n/500 Blausäure (d. h. einer Lösung von n/500 KCN, die durch Zusatz äquivalenter Mengen Essigsäure neutralisiert ist) bestimmt; dann wurde die Kohle aus dem Atmungstrog entfernt, abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, wieder abzentrifugiert und, aufs neue mit Leucinlösung versetzt, in das Atmungsgefäß zurückgebracht.

Tabelle I.

Leucinoxydation an Kohle. Temperatur: 37°, Gasraum: reiner Sauerstoff, Flüssigkeitsmenge: 8 ccm. $5 \cdot 10^{-2}$ n Leucin, $2 \cdot 10^{-3}$ n HCN, 0,1 g Kohle geglüht. cmm O_2 pro 0,1 g Kohle und 1 Stunde.

Nr.	Ohne HCN	Mit HCN	Hemmung vorher Proz.	Nach dem Waschen ohne HCN	Nach dem Waschen mit HCN	Hemmung nachher Proz.	Bemerkungen
1	297	25	92		119	60	Einmal gewaschen
					184	38	2 Stdn. "
2	—	—		231	219	5	Einmal "
				227,5	241	0	1 Std. "
3	325,5	30	89		263	20	Einmal "
					223,5	31	3 Stdn. "

Wie aus den angegebenen Zahlen hervorgeht, ist die Vergiftung innerhalb der Versuchsgenauigkeit reversibel. Die Hemmung, die in

[1]) *Warburg*, diese Zeitschr. 152, 51, 1924.
[2]) l. c., S. 281.

n/500 Blausäure über 90 Proz. beträgt, wird schon durch einmaliges Waschen mit Wasser nahezu aufgehoben (Versuch Nr. 2). Daß die absoluten Zahlen für die Oxydation sowohl in der vergifteten wie unvergifteten Probe nach dem Waschen etwas zurückgegangen sind, liegt daran, daß es nicht gelingt, die Kohle quantitativ ins Atmungsgefäß zurückzubringen; eine kleine Menge geht beim Umfüllen usw. verloren.

Aber schon in diesen Versuchen zeigte sich, daß die Erzielung eines völligen Rückgangs der Blausäurewirkung von nicht genau übersehbaren Bedingungen abhängt. Ungeglühte Kohle, die erheblich schwächer wirksam ist als geglühte, zeigte nach dem Waschen keinen Rückgang der Hemmung. Offenbar ist hier die Bindung des Eisens so verändert, daß sowohl eine schwächere Sauerstoffübertragung als auch eine festere Bindung des CN resultiert. Eine Analogie hierzu bietet vielleicht die frühere Beobachtung von *Warburg*, daß Zuckerkohle, die mit Eisen getränkt ist, gegenüber Aminosäuren unwirksam ist, durch Glühen jedoch eine gewisse Aktivität gewinnt[1]).

II. Versuche mit Palladiumschwarz.

Die Katalysen an den Metallen der Platinreihe werden durch Blausäure gehemmt. Vor kurzem hat *Tanaka*[2]) die Blausäurehemmung der Wasserstoffperoxydzersetzung und der Alkoholoxydation durch Palladiumschwarz aufs neue untersucht. Diese beiden Katalysen habe ich im Hinblick auf die Frage der Reversibilität der Blausäurewirkung geprüft. Das Palladiumschwarz wurde nach Vorschrift von *Wieland*[3]) hergestellt und 24 Stunden in wässeriger Suspension mit Sauerstoff gesättigt.

a) Wasserstoffperoxydzersetzung.

Methodik.

Die bei den einzelnen Versuchen angewandten Mengen Palladiumschwarz betrugen 0,03 bis 0,05 mg (auf der Mikrowage gewogen); sie wurden in eine Gesamtflüssigkeit von 2,5 ccm suspendiert. Die Lösung war meist mit einem Phosphatpuffergemisch (m/25) versetzt von p_H 8; die Anfangskonzentration des Wasserstoffperoxyds war 0,48 Proz. Unter diesen Bedingungen fällt die Zersetzungsgeschwindigkeit ziemlich stark ab, da die Konzentration des H_2O_2 rasch zurückgeht. Die ersten Ablesungen wurden 15 Minuten nach Beginn der Reaktion gemacht. Die Meßgefäße hatten einen Rauminhalt von 12 bis 15 ccm; im Gasraum befand sich Luft; gemessen wurde die Druckzunahme durch den entstehenden Sauerstoff. Temperatur 37°.

---

[1]) Chem. Ber. **59**, 739, 1926.
[2]) Diese Zeitschr. **157**, 425, 1925.
[3]) Chem. Ber. **45**, 484, 1912.

Die Ergebnisse waren die gleichen wie mit Kohle; wenn man zwei Palladiummengen, von denen die eine mit n/2000 Blausäure versetzt ist, die andere nicht, kurze Zeit ein- bis zweimal mit Wasser auswäscht, abzentrifugiert und beide Proben auf die Geschwindigkeit der H_2O_2-Zersetzung untersucht, so ist die Hemmung, die vorher 70 und 80 Proz. betrug, nach dem Waschen völlig zurückgegangen.

Tabelle II.

Sauerstoffbildung aus H_2O_2 in cmm pro 5 Minuten und 0,01 mg Palladium.

Nr.	Vor dem Waschen			Nach dem Waschen		
	ohne Blausäure	mit n/2000 Blausäure	Hemmung Proz.	ohne Blausäure	mit n/2000 Blausäure	Hemmung Proz.
1	61	14,5	76	44,5	37,5	16
2	181,5	48	73,5	94,5	103	0
3	108,5	24,5	78	44,5	47	0
4	149	37,5	75	85,5	119	0

b) Alkoholoxydation.

Methodik.

Die Alkoholoxydation wurde wie bei *Tanaka* in n/10 Schwefelsäure gemessen. Die Palladiummenge betrug 1 bis 3 mg, die Gesamtflüssigkeitsmenge 2,5 ccm, die Alkoholkonzentration 5 Gew.-Proz. Im Versuch wurde die Kohlensäure durch Kalilauge im Einsatz absorbiert; gemessen wurde der Sauerstoffverbrauch, im Gasraum befand sich Luft. Temperatur 37°.

Schon in den ersten Versuchen stellte sich heraus, daß die Hemmung der Alkoholoxydation ganz anders verläuft als die bisher besprochenen Fälle. Wird das mit Blausäure vergiftete Palladium ebenso behandelt wie im Falle der H_2O_2-Zersetzung, so ist noch kein Rückgang der Hemmung eingetreten. Erst bei sehr anhaltendem Waschen oder längerem Gasdurchleiten ist nach einer Reihe von Stunden die Vergiftung ein wenig zurückgegangen. Aus dieser auffälligen Verschiedenheit zwischen dem Verhalten der beiden Reaktionen gegen HCN geht hervor, daß ein Teil der Blausäure auch nach dem Waschen noch an das Palladium gebunden ist. Dieser fester gebundene Anteil kann die Alkoholoxydation aufheben, hemmt dagegen offenbar die Wasserstoffperoxydzersetzung entweder nicht oder nur geringfügig.

Der Hauptunterschied zwischen der Anordnung der beiden Versuchsreihen liegt darin, daß bei gleicher Flüssigkeitsmenge die angewandte Palladiummenge bei der Alkoholoxydation etwa 30- bis 50mal so groß ist wie bei der H_2O_2-Zersetzung. Da das Palladium einen Teil der Blausäure bindet, konnte man von vornherein annehmen, daß die Blausäurekonzentration der Flüssigkeit während des Versuchs mit H_2O_2 wenig von der aus der zugesetzten Menge HCN berechneten

Konzentration abweicht, während die relativ große Palladiummenge bei der Alkoholoxydation bewirken mußte, daß die Blausäurekonzentration während des Versuchs gegenüber der zugesetzten verringert ist. Um dies festzustellen, habe ich in einem solchen Falle die Flüssigkeit, die ursprünglich einen die Alkoholoxydation hemmenden Gehalt an Blausäure besaß, vom Palladium abzentrifugiert und aufs neue Palladium zugesetzt. Tatsächlich war dann die Größe der Alkoholoxydation ebenso groß wie in blausäurefreier Lösung. Es hatte also das Palladium des ersten Versuchs die gesamte in der Flüssigkeit vorhandene Blausäure gebunden, wobei eine Hemmung von etwa 70 Proz. aufgetreten war (s. Versuch 1 und 2).

Bindung der Blausäure an das Palladium.

Versuch 1.

	Im Zentrifugenglas	
	A	B
Palladium . . . . . mg	2,07	2,106
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	2,5	2,5
Alkoholkonzentration . . . Proz.	5	5
Schwefelsäurekonzentration. . . .	n/10	n/10
Blausäurekonzentration berechnet .	n/5000	0

Zentrifugiert und Flüssigkeit aus Glas:

A + 0,793 mg Pd + 1 ccm 12,5proz. Alkohol in Gefäß 1.
B + 0,780 „ „ + 1 „ 12,5 „ „ „ „ 2.

	Gefäß 1		Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd
In 15 Minuten . . .	6	7,5	6	7,5
„ 15 „ . . .	4,5	6	6	7,5
„ 15 „ . . .	6	7,5	6,25	8
„ 15 „ . . .	4,5	6	5	6,5

Versuch 2.

	Im Zentrifugalglas	
	A	B
Palladium . . . . . mg	1,94	1,986
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	2,5	2,5
Alkoholkonzentration. . . . Proz.	5	5
Schwefelsäurekonzentration. . . .	n/10	n/10
Blausäurekonzentration berechnet .	n/5000	0

Zentrifugiert und Flüssigkeit aus Glas:
A + 0,987 mg Pd + 1 ccm 12,5proz. Alkohol in Gefäß 1.
B + 0,982 „ „ + 1 „ 12,5 „ „ „ „ 2.

	Gefäß 1		Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd
In 15 Minuten . . .	8,5	8,5	6	6
„ 15 „ . . .	8	8	7	7
„ 15 „ . . .	7,0	7,5	5,5	5,5

Danach scheint es, als ob der Unterschied in der Blausäurewirkung auf die beiden Prozesse im wesentlichen ein Unterschied der Konzentration ist. Die Blausäure wird bei einem Überschuß von Palladium von diesem völlig aufgenommen. Diese Blausäure-Palladiumverbindung ist nicht fähig, die Alkoholoxydation zu katalysieren. Dagegen besteht die Fähigkeit zur Zersetzung von H_2O_2 weiter fort. Diese Bindung an das Palladium ist relativ fest und geht in reinem Wasser nur sehr langsam zurück. Bei weiterem Zusatz von Blausäure wird ein Teil in lockerer, leicht reversibler Form an das Palladium angelagert, so daß jetzt ein Gleichgewicht zwischen dem gebundenen und dem in Lösung befindlichen Anteil eintritt. Diese Form der Bindung des CN an das Pd macht dieses unfähig, das H_2O_2 zu zersetzen. Diese Hemmung geht aber durch kurzes Waschen zurück.

Daß diese Auffassung von der Verschiedenheit der Blausäurewirkung zutrifft, läßt sich durch die folgende Versuchsreihe belegen. Bei der Alkoholoxydation ist die Stärke der Blausäurehemmung nicht durch die berechnete Blausäure*konzentration*, sondern durch die *Menge* der vorhandenen Blausäure bestimmt. Bei gleicher berechneter Blausäurekonzentration und gleicher Palladiummenge ist die Hemmung der Katalyse größer bei größerer Flüssigkeitsmenge, s. Versuch 3.

Versuch 3.

Einfluß der Flüssigkeitsmenge auf die Blausäurehemmung.

	Gefäß 1	Gefäß 2
Palladium . . . . . mg	1,19	1,16
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	2,5	5,0
Alkoholkonzentration . . . Proz.	5	5
Schwefelsäurekonzentration	n/10	n/10
Blausäurekonzentration berechnet .	n/10000	n/10000

	Gefäß 1			Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd		cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd
In 45 Minuten	22,5	18	In 45 Minuten	1,0	0,8

Bei gleicher berechneter Blausäurekonzentration und Flüssigkeitsmenge ist die Hemmung größer bei kleinerer Palladiummenge s. Versuch 4. Dagegen ist bei der H_2O_2-Zersetzung eine Abhängigkeit der Vergiftung vom Verhältnis Palladiummenge zu Blausäuremenge nicht nachweisbar, s. Versuch 5. Die Hemmungsstärke entspricht hier der berechneten Blausäurekonzentration.

Versuch 4.

Einfluß der Palladiummenge auf die Blausäurehemmung.

	Gefäß 1	Gefäß 2
Palladium . . . . . mg	1,429	0,734
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	2,5	2,5
Alkoholkonzentration . . . . Proz.	5	5
Schwefelsäurekonzentration	n/10	n/10
Blausäurekonzentration berechnet	n/10000	n/10000

	Gefäß 1			Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd		cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd
In 60 Minuten	81,5	57	In 60 Minuten	4,5	6

Danach Palladium aus Gefäß 1 mit n/10000 Blausäure gewaschen und dann mit 2,5 ccm Flüssigkeit (5proz. Alkohol, n/10 H_2SO_4, keine Blausäure) in Gefäß 1.

	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro mg Pd
In 60 Minuten	10,5	7,5

Versuch 5.

Einfluß der Flüssigkeitsmenge auf die Blausäurehemmung bei der H_2O_2-Zersetzung.

	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4
Palladium . . . . . mg	0,043	0,075	0,056	0,074
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	2,5	2,5	10,0	10,0
H_2O_2-Konzentration . . . Proz.	0,48	0,48	0,48	0,48
Phosphatpufferkonzentr. (p_H 6,98)	m/25	m/25	m/25	m/25
Blausäurekonzentration	0	n/5000	0	n/5000
cmm O_2 pro 0,01 mg Pd pro 5 Min.	11,9	3,5	12,9	3,0
Hemmung . . . . . Proz.	70		77	

III. Die Fructoseoxydation in Phosphatlösung.

Die bisher untersuchten Katalysen waren heterogene Katalysen. Die katalytische Wirkung kommt an Oberflächen zustande. Als Beispiel für die Blausäurevergiftung einer homogenen Katalyse wurde die Fructoseoxydation in Phosphatlösung untersucht. Nach *Meyerhof* und *Matsuoka*[1]) hemmt die Blausäure diese Reaktion, und zwar zunehmend stärker bei wachsender Alkaleszenz, offenbar weil die Komplexbindung des Cyans mit dem Katalysator bei neutraler und saurer Reaktion zu gering ist. Es erschien daher wahrscheinlich, daß die Blausäure aus dem System am ehesten zu entfernen ist, wenn man die Lösung bis etwa auf p_H 4,5, d. h. bis zur Reaktion von primärem Phosphat ansäuert. Die Versuche wurden deshalb folgendermaßen angeordnet: Es wurde zuerst die Oxydation von 3 ccm 5proz. Fructoselösung in m-Phosphat von p_H 8,3 (sekundäres Natriumphosphat) bestimmt. Gleichzeitig wurde eine Probe mit n/240 Blausäure gehemmt. Dann wurden die Lösungen durch Zusatz von 3 ccm n H_2SO_4 in primäres Phosphat umgewandelt. Diese Lösungen wurden durch Evakuierung und Luftdurchleitung unter schwacher Erwärmung von überschüssiger Blausäure befreit. Nachher wurden 3 ccm n NaOH zugesetzt und aufs neue die Oxydationsgröße gemessen. Der Vergleich der vergifteten und nicht vergifteten Probe zeigt, daß die Blausäurehemmung auf diesem Wege fast völlig aufgehoben wird, s. Versuch 6. Dies gelingt nicht bei Aufrechterhaltung der ursprünglichen H-Ionenkonzentration, da in neutraler oder schwach alkalischer Reaktion die Blausäure nicht zu entfernen ist.

Versuch 6.

Fructoseoxydation. Reversibilität der Blausäurewirkung.

Temperatur 37°; im Gasraum Luft.

	Gefäß 1	Gefäß 2
Flüssigkeitsmenge . . . . . ccm	3	3
Phosphatkonzentration	m/1	m/1
Fructosekonzentration . . . Proz.	5	5
Blausäurekonzentration	0	n/240

	Gefäß 1			Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro Stunde		cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro Stunde
In 20 Minuten	159,5	487,5	In 20 Minuten	32,5	97,5
„ 15 „	127,5	510	„ 20 „	28	84
„ 20 „	167	501	„ 20 „	32	90

[1]) Diese Zeitschr. 150, 1, 1924.

Danach mit je 3,0 ccm n H_2SO_4 versetzt, evakuiert, Luft durchgesaugt, erwärmt; dann nach 3 Stunden je 3,0 ccm n NaOH zugesetzt.

	Gefäß 1		Gefäß 2	
	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro Stunde	cmm O_2 beobachtet	cmm O_2 pro Stunde
In 20 Minuten . . .	185,5	456,5	41	123
„ 20 „ . . .	166,5	499,5	111	333
„ 20 „ . . .	130	390	153,5	461,5
„ 20 „ . . .	111	333	124	372

Man kann hieraus schließen, daß die Bindung Katalysator-Blausäure bei schwach saurer Reaktion lockerer ist, und dies läßt sich auch an den komplexen Cyan-Schwermetallverbindungen demonstrieren: Ferrocyankalium gibt mit Kupferionen die bekannte rotbraune Farbreaktion von Ferrocyankupfer. Bei Anwesenheit genügender Mengen KCN tritt die Reaktion nicht mehr auf. Wenn man diese Reaktion in Gegenwart von primärem Phosphat anstellt bzw. von sekundärem Phosphat, das durch eine äquivalente Menge n H_2SO_4 in primäres verwandelt ist, so zeigt sich, daß nach mehrstündigem Luftdurchsaugen die vorher durch HCN unterdrückte Bildung des Ferrocyankupfers nunmehr wieder auftritt. Unterläßt man dagegen das Ansäuern der sekundären Phosphatlösung während des Auspumpens, so bleibt die Reaktion negativ. —

Anhangsweise seien einige außerhalb unseres Themas gelegene Versuche über die narkotische Hemmung der Wasserstoffsuperoxydzersetzung an Palladium erwähnt. Daß die Peroxydzersetzung durch kolloidales Platin von indifferenten Narkoticis gehemmt werden kann, ist früher von *O. Meyerhof* beschrieben worden[1]). Es konnte gefragt werden, ob die Hemmungsstärke der Narkotica bei Palladiumschwarz und Palladiumsol gleich ist, oder ob in Analogie der verschiedenen Wirkungsstärke der Narkotica auf die Strukturkatalyse der Zellen und die Katalyse an Extrakten nach *Warburg*[2]) auch hier eine verschiedene Hemmungsstärke zu beobachten ist. In diesem Falle hätte man ein einfaches physikalisches Modell, um die Verschiedenheit der Hemmungen zu deuten, nämlich daß die Oberflächenkräfte an den Ultramikronen des Sols wegen der zu geringen Masse jedes Teilchens bzw. der starken Krümmung der Oberfläche gegenüber den ausgedehnten Oberflächen des festen Moores verringert wären. Doch ergaben die Versuche keinen Unterschied der Hemmungen, so daß jedenfalls bei den hier in Betracht kommenden Größen der Teilchen eine Verschiedenheit der Adsorption nicht zu beobachten ist. Es sei daher auf die Wiedergabe der Messungen verzichtet.

[1]) Pflügers Arch. f. Physiol. 157, 307, 1914.
[2]) Siehe z. B. *A. Dorner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 99, 1912.

In der vorangehenden Arbeit wurde eine Reihe von Metallkatalysen, die als Modelle von Zelloxydationen dienen können, hinsichtlich der Reversibilität der Blausäurewirkung untersucht. Zusammenfassend können wir das Ergebnis folgendermaßen darstellen:

1. Die Vergiftung der Leucinoxydation an gut wirksamer, frisch geglühter Tierkohle ist nach kurzem Waschen vollständig reversibel.

2. Von den Palladiumkatalysen erweist sich die Blausäurehemmung der Wasserstoffsuperoxydzersetzung ebenfalls als leicht reversibel, während das mit Blausäure vergiftete Palladiumschwarz die Fähigkeit, Alkohol zu oxydieren, nur äußerst langsam wiedererlangt. Es wird durch Versuche wahrscheinlich gemacht, daß dieser Unterschied darauf beruht, daß das Palladium Blausäure in zwei verschiedenen Formen bindet, einmal relativ fest, wobei bei kleiner Blausäuremenge im Vergleich zum Palladium die gesamte Blausäure fest gebunden wird, und dann bei Zusatz relativ größerer Blausäuremengen in lockerer Bindung, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen dem Palladium und der Suspensionsflüssigkeit herstellt.

3. Die Fructoseoxydation in Phosphatlösungen, die bei alkalischer Reaktion durch Blausäure gehemmt wird, stellt sich wieder her, wenn während des Evakuierens und Erwärmens das Phosphat bis zur Reaktion einbasischen Salzes angesäuert wird, da bei dieser Reaktion (p_H 4,5) die Komplexverbindung Katalysator-Blausäure unbeständiger ist als bei p_H 8,3.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß auch bei den Modellkatalysen in geeigneten Fällen die Blausäurehemmung auf physikalischem Wege rückgängig gemacht werden kann. Daher kann die Tatsache der leichten Reversibilität der Vergiftung in den lebenden Zellen kein Argument gegen die Annahme sein, daß die Hemmung der Atmung durch Blausäure auf die Bildung einer Komplexverbindung zwischen der Blausäure und den Schwermetallbestandteilen des Atmungsferments zurückzuführen ist.

Zur Kenntnis der Bedeutung der Blausäure bei der Metallvergiftung der Enzyme.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin).

(Eingegangen am 3. Juni 1926.)

Während die Blausäure als Hemmungssubstanz für anorganische und biochemische Katalysatoren schon lange erkannt worden ist, hat sie in den letzten Jahrzehnten bei dem Studium der Metallvergiftungen der Enzyme als Reaktivierungssubstanz biochemisches Interesse erlangt. Zunächst fand *Hata*[1]) in meinem Laboratorium, daß man verschiedene Enzyme, welche mit Quecksilbersublimat inaktiviert waren, durch nachträgliche Zufügung von Cyankalium wieder vollkommen reaktivieren kann. Bei der Urease habe ich dann den Vorgang genauer untersucht und auf mehrere Metalle und Reaktivierungssubstanzen ausgedehnt. Es folgten die interessanten Untersuchungen von *Euler* und *Svanberg*[2]), welche namentlich das interessante Phänomen der spontanen Reaktivierung aufdeckten. Bei meinen Ureaseversuchen ergab sich die interessante Erscheinung, daß bei bestimmten Enzympräparaten und unter geeigneten Versuchsbedingungen das Cyankalium auch ohne vorausgeschickte Metallvergiftung die Enzymwirkung verstärkt. Aus diesen Versuchen entwickelten sich dann die Vorstellungen über Auxokörperwirkung, die vorläufig sicherlich noch nicht genügend beachtet werden, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll[3]).

Es schien mir nun möglich, das Wesen der Metallverbindungen der Enzyme weiter zu klären, wenn man an die bedeutsamen Entdeckungen von *Willstätter* und seinen Mitarbeitern über die Wirkung

---

[1]) Diese Zeitschr. **17**, 156, 1909.
[2]) Arkiv f. Kemi **7**, Nr. 27, 1920; Fermentforschung **8**, 1920; **4**, 1921.
[3]) Diese Zeitschr. **76**, 275, 1916; **104**, 316, 1920.

der Blausäure auf das Papain anknüpft. Daß die Metallverbindungen der Enzyme eine besondere Bedeutung haben, ist wohl sicher, da sie einfacher als andere Enzymverbindungen zu beurteilen sind.

Bekanntlich haben *Willstätter* und *Graßmann*[1]) gefunden, daß die Blausäure pflanzlichen Proteasen, insbesondere dem Papain gegenüber sich so verhält, wie die Enterokinase gegenüber dem Trypsin. Hier interessiert uns besonders die Beobachtung der Autoren, daß Papain ohne Blausäurezusatz Gelatine nicht verdaut, und daß man eine ganz bestimmte Blausäuremenge ermitteln kann, welche für eine bestimmte Papainmenge notwendig ist, damit Gelatine verdaut wird. Diese Versuche gaben für unsere Vergiftungsstudien wertvolle Hinweise, so daß wir an sie direkt anknüpfen.

Tsuchihashi[2]) hat vor einigen Jahren in meinem Laboratorium gefunden, daß das Pepsin von verschiedenen Metallen in sehr verschiedener und charakteristischer Weise vergiftet wird. Während *Jacoby* und *Shimizu*[3]) für die Sojaurease gefunden hatten, daß das Enzym nicht durch Eisen, wohl aber durch Kobalt, Nickel, Kupfer und Zink inaktiviert wird, ergab sich in *Tsuchihashis* Versuchen folgendes: Pepsin zeigt eine Empfindlichkeit für Zink und Kupfer und etwas weniger für Eisen und Kobalt und keine für Nickel.

Ursprünglich ging ich von der Überlegung aus, ob durch das vergleichende Studium der Metallverbindungen des Pepsins und des Papains sich etwas über die Verwandtschaft der beiden Enzyme ermitteln ließe. Diese Fragestellung habe ich jedoch dann zunächst zurückgestellt, nur die sofort gemachte Beobachtung wurde weiterhin verwertet, daß Zink auch für Papain ebenso wie für das Pepsin sehr giftig ist und daß Nickel, das gegenüber den verschiedensten Ureasen hoch wirksam ist, gegenüber Papain ebenso unwirksam ist wie gegen Pepsin. Bis zu einem gewissen Grade bestehen also jedenfalls für bestimmte Enzymgruppen spezifische Metallwirkungen.

In dieser Mitteilung wandte sich aber nun die Untersuchung zunächst der Frage zu, wie sich die Vergiftbarkeit des Papains durch Metalle zu der Blausäurekomponente des Enzyms verhält. Von Interesse erwiesen sich für die Klärung dabei auch die quantitativen Verhältnisse.

Es wurde folgende einfache, aber doch völlig beweisende Versuchsanordnung gewählt. Als Indikator der eingetretenen proteolytischen Wirkung wurde die Verflüssigung von Gelatine benutzt. Alle Versuche wurden mit einem *Merck*schen Präparat: „Papain 1 : 80" gemacht. Das

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **183**, 184, 1924.
[2]) Diese Zeitschr. **140**, 149, 1923.
[3]) Ebendaselbst **128**, 89, 1922.

Präparat ist in Wasser schlecht löslich, es verflüssigt bei der gewählten Versuchsanordnung ohne Zusatz von Cyankalium nicht Gelatine.

Der Grad der Verflüssigung wird durch Zeichen ausgedrückt:

++++ ganz flüssig,
+++ fast ganz flüssig,
++ zum Teil flüssig,
+ Spur flüssig (weich)
— fest.

Die Gemische kamen immer für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37°, wurden dann 18 Stunden bei etwa 20° gehalten, dann in Eiswasser gebracht, wo die Ablesung erfolgte. Genauer gesagt, erfolgte die Ablesung immer in drei Etappen, zuerst vor der Übertragung in das Eiswasser, dann im Eiswasser und 15 Minuten nach Entfernung aus dem Eiswasser. Eine ähnliche Form der Ablesung hatte sich schon in den Versuchen von *Tsuchihashi* bewährt.

Ein großer Teil der Versuche wurde mit Mischungen angestellt, die mit Phosphaten gepuffert waren, wobei das p_H variiert wurde. Die Versuche fallen in ziemlich breiten Grenzen bei wechselndem p_H gleichmäßig aus. Wir kommen darauf noch zurück.

Zunächst geben wir einen Versuch wieder, der zeigt, daß das Papain die Gelatine ohne Zufügung von Cyankalium nicht löst.

In die einzelnen Proben kommt eine verschieden konzentrierte Cyankaliumlösung, immer je 0,5 ccm, dann 0,5 ccm Papain (1proz., filtrierte, wässerige Lösung). 1proz. ist so zu verstehen, daß 1 g in 100 Wasser aufgenommen wurde, gelöst hat sich nur ein Bruchteil davon. Zum Schluß 5 ccm Gelatine (5proz.).

Menge des Cyankaliums in jeder Probe mg	Gelatineverflüssigung
0,5	++++
0,05	++++
0,005	—
0	—

Wir geben nur diesen einen Versuch, weil das Resultat immer dasselbe war: Ohne Cyankalium keine Wirkung, für die jeweilige Papainmenge war eine bestimmte Cyankaliummenge immer mindestens notwendig, um die Verflüssigung zu erzielen.

Wenn man in den Versuchen *Tsuchihashis* Pepsin mit Zink zusammenbrachte, so wurde das Enzym inaktiviert. Bei den Papainversuchen erhebt sich nun die Frage, ob die Inaktivierung des Papains durch Zink schon erfolgt, wenn das Papain noch nicht mit Cyankalium vorbehandelt ist oder ob diese Vorbehandlung zugleich die Vorbedingung

für die Zinkinaktivierung ist. Für diese Fragestellung ist die von mir seit Jahren bei derartigen Vergiftungsversuchen mit Metallen ausprobierte Versuchsanordnung sehr brauchbar, vielleicht direkt unentbehrlich.

Ich bringe das trockene, unlösliche oder kaum lösliche Metallpulver, in unserem Falle: Zinkpulver „Zinkstaub extrafein" von *Kahlbaum*, in ein spitzes Zentrifugenglas, füge die klare Fermentlösung hinzu, lasse eine bestimmte Zeit bei bestimmter Temperatur unter häufigem Umrühren Metallpulver und Enzymlösung zusammen. Dann wird zentrifugiert und filtriert und die klare Lösung verwendet. Von Bedeutung für den endgültigen Enzymversuch sind also nur die Metallspuren, welche bei diesem Vorgehen durch die Fermentlösung in Lösung gebracht werden. Zunächst ist das Metall in beliebigem Überschuß vorhanden, wird aber vor dem eigentlichen Versuch, soweit es nicht in Reaktion getreten ist, quantitativ ohne chemische Eingriffe entfernt. Versuche mit löslichen Metallsalzen sind für die vorliegende Fragestellung ungeeignet, da wir ja das überschüssige Metall vor Zufügung des Cyankaliums entfernen wollen.

Versuch.

A. 5 ccm Papainlösung (1 proz.) + 0,5 g Zinkpulver.
B. 5 „ „ (1 „) ohne Zinkpulver.

Nach 2 Stunden Aufenthalt im Brutschrank und häufigem Umrühren werden die Lösungen zentrifugiert und filtriert. Zu den Filtraten kommen je 2 ccm Cyankalium (1 proz.).

Dann werden von A und B Proben von je 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 und 0 angesetzt, Auffüllung mit einem Gemisch von 5,0 Wasser + 2,0 Cyankalium (1 proz.), dann 5 ccm Gelatine. Bei Abschluß der Verdauung sind bei A und B die Proben 0,5 bis 0,1 ++++, die 0-Proben −.

Das zweistündige Zusammenbringen des nicht durch Cyankalium aktivierten Papains mit dem Zink ist also ganz ohne Einfluß auf das Enzym geblieben.

Ganz anders gestaltet sich das Bild, wenn man erst das Papain mit dem Cyankalium zusammenbringt und dann erst auf das aktivierte Enzym das Metall einwirken läßt. Hier werden sehr beträchtliche Einwirkungen des Metalls beobachtet.

Versuch.

5 ccm Papainlösung (1 proz.) werden mit 2 ccm Cyankalium (1 proz.) versetzt. Es wird dieses Gemisch in einer Probe mit 0,5 g Zink zu-

sammengebracht, eine Kontrolle ohne Zink angesetzt. Sonst wird wie im vorigen Versuch verfahren.

Mit Zink alles —.
Ohne Zink 0,5 bis 0,3 ++++, 0,2 +++, 0,1 und 0 —.

Versuch.

Mit Zink alles —.
Ohne Zink 0,5 bis 0,2 ++++, 0,1 +++/++++, 0 —.

Zahlreiche Versuche fielen entsprechend aus, mit Zink war nie Verdauung zu beobachten, ohne Zink bestand stets gute Verdauung, die Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen waren in dieser Beziehung nur unerheblich.

In weiteren Versuchen wurde nunmehr die Konzentration des Cyankaliums geändert. Während in den oben mitgeteilten Versuchen zu 5 ccm der 1proz. Papainlösung 2 ccm einer 1proz. Cyankaliumlösung hinzugefügt wurden, wurde nunmehr bei sonst völlig unabgeänderten Bedingungen die Einwirkung von 2proz. Cyankaliumlösung bis herab zu 0,025proz. untersucht.

Konzentration des Cyankaliumzusatzes Proz.	Hemmung durch Zink
2	Vollkommene Hemmung
1	„ „
0,2	Geringe „
0,1	Kaum „
0,05	„ „
0,025	Cyankalium reicht nicht mehr zur Enzymaktivierung aus

Das Ergebnis dieser Versuche erscheint zunächst paradox. Von vornherein hätte man annehmen können, daß in Gegenwart größerer Cyankaliummengen das Zink nicht auf das Papain einwirkt, weil es durch das Cyankalium ausgeschaltet wird. Dieser Zusammenhang, wie er z. B. bei unseren Urease-Nickelversuchen bestand, war für Papain-Zink allerdings schon deshalb unwahrscheinlich, weil wir feststellten, daß das Zink nicht direkt mit dem Papain reagiert. Man konnte sich nun denken, daß das Zink die freien Blausäuregruppen des Papains besetzt und das Enzym dadurch inaktiviert. Dann würde ein Überschuß an Cyankalium, der nicht an das Papain gebunden ist, das Zink abfangen und dadurch das Papain vor der Inaktivierung schützen müssen. Man sollte also bei kleinen Cyankaliumdosen Inaktivierung, bei großen Dosen Ausbleiben der Inaktivierung erwarten.

In Wirklichkeit ergibt sich das umgekehrte Bild: Nur bei hohen Cyankaliumkonzentrationen wirkt das Zink inaktivierend, bei kleineren Dosen, die aber vollständig zur Inaktivierung des Papains ausreichen, versagt das Zink. Bei den kleinsten Cyankaliumdosen, bei denen das Papain unwirksam ist, kann man selbstverständlich eine Einwirkung des Zinks nicht mehr erkennen.

Man gelangt zu einer Deutung unserer Befunde, wenn man sich der Annahme *Willstätters* anschließt, nach der die Blausäure an das Papain gebunden wird. Man wird weiter annehmen dürfen, daß nicht nur die Blausäuremenge vom Papain gebunden werden kann, welche unbedingt für den Verdauungseffekt notwendig ist. Es ist wahrscheinlich, daß bei Vorhandensein eines Überschusses von Cyankalium mehr, als für die Verdauungswirkung notwendig ist, gebunden wird. Dann wird es verständlich, daß durch die im Überschuß vorhandene, an das Enzym gebundene Blausäure das Metall in den Wirkungsbereich des Enzyms gezogen und dadurch die Enzymwirkung gehemmt wird.

Wir kämen also zu der Vorstellung, daß bei hinreichender Cyankaliumkonzentration mit dem Papain sich neben den für die Enzymwirkung notwendigen Blausäuregruppen noch weitere Blausäuregruppen verbinden, die nunmehr für die Reaktion mit dem Metall disponibel sind, als Bindeglied zwischen Enzym und Metall funktionieren und so das Zustandekommen der inaktiven Enzym-Metallverbindung ermöglichen.

Mit diesen Erörterungen berühren wir eine Frage, die bei der Inaktivierung der Enzyme durch chemische Stoffe immer diskutiert werden muß: Erfolgt die Inaktivierung des Enzyms durch Besetzung der enzymatisch wirksamen Gruppen oder beeinflußt die Inaktivierungssubstanz nur den Enzymkomplex als ganzes, indem sie sich mit anderen Gruppen des Komplexes verbindet? In unserem Falle ist vielleicht eine klarere Erkenntnis als in anderen Fällen möglich. Wir sehen, daß zwar nicht die enzymatisch reagierenden Gruppen direkt besetzt werden, wohl aber Gruppen, welche qualitativ den enzymatisch wirksamen Gruppen entsprechen. Im strengen Sinne kommt also die Inaktivierung nicht einfach durch die Besetzung der reagierenden Gruppe, sondern doch durch eine Abänderung des Enzymkomplexes zustande.

Ähnliche Wirkungen wie mit Zink wurden mit Kupfer, Eisen, Kobalt und Nickel nicht erzielt. Wohl waren Spuren von Hemmung vorhanden, die aber quantitativ keinen Vergleich mit der Zinkhemmung aushielt. Absolut ohne Wirkung war Nickel, das die Urease so intensiv hemmt.

Versuche mit löslichen Metallsalzen ergaben beim Zink — entsprechend der Vorstellung, daß nur das in Lösung gehende Metall in

Wirksamkeit tritt — schon in minimalen Dosen, Bruchteilen von Milligrammen, vollkommene Hemmung, während Nickelchlorür auch in Lösung nicht hemmt.

Zusammenfassung.

1. Papain wird in seiner gelatinolytischen Funktion durch Zink nur inaktiviert, wenn das Metall in Gegenwart von Cyankalium mit dem Enzym zusammengebracht wird.

2. Nur bei Überschuß von Cyankalium kommt die Inaktivierung zustande.

3. Die Inaktivierung durch Metalle ist bei der gelatinolytischen Enzymwirkung des Papains ähnlich der Inaktivierung beim Pepsin, durchaus verschieden aber der Inaktivierung bei der Urease.

Die Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft hat mir für diese Untersuchungen Mittel zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle ergebensten Dank sage.

Über den Einfluß der experimentellen Säurevergiftung und der Nebennierenexstirpation auf die anorganischen Kationen des Blutserums.

Von

Karl Keitel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Hamburgischen Universität, Allgemeines Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 4. Juni 1926.)

Wenn einem Hunde intravenös Salzsäure injiziert wird, so sind bekanntlich eine Anzahl von Regulationsmechanismen vorhanden, durch die die Säure zunächst neutralisiert und dann aus dem Organismus ausgeschieden wird. Zu diesen gehört die Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak in der Leber, wobei die Säure dann an das Ammoniak gebunden und als Ammoniumchlorid ausgeschieden wird. Ein zweiter Regulationsmechanismus ist der, daß durch die injizierte Säure das Atemzentrum gereizt, dadurch eine vermehrte Lungenventilation hervorgerufen und als Folge davon eine vermehrte Ausscheidung von CO_2 bewirkt wird.

Die fixen Alkalien des Blutes sowohl als auch die der Gewebe müßten dabei die HCl binden, und die betreffenden Neutralsalze dann verhältnismäßig schnell durch die Nieren ausgeschieden werden. Einerseits müßten also derartige Neutralsalze aus den Geweben und Gewebssäften ins Blut transportiert werden, um später durch die Nieren ausgeschieden zu werden, andererseits aber auch fixe *Alkalien des Blutes selbst* durch die Säure in Beschlag genommen werden, wobei ebenfalls anzunehmen ist, daß auch diese neugebildeten Neutralsalze relativ schnell durch die Nieren ausgeschieden werden. Falls dieser letzte Prozeß, nämlich der der Bildung von Neutralsalzen im Blute, den anderen Prozeß, nämlich den der Bildung solcher Salze in den Geweben überwiegen würde, könnte man sogar vermuten, daß von den neugebildeten Neutralsalzen ein Teil in den Geweben, insbesondere Haut und Muskulatur, deponiert würde, ähnlich, wie wir es nach der Injektion starker NaCl-Lösungen in das Blut sehen.

Es ist bei diesem komplizierten Geschehen nicht ohne weiteres ersichtlich, ob die fixen Alkalien des Blutes bei der Säurevergiftung zu- oder abnehmen. Daher haben wir einige Versuche angestellt, in denen wir bei Hunden die fixen Alkalien des Blutes bestimmten.

Methodik.

Möglichst großen Hunden, die 24 Stunden gehungert hatten, wurde aus der Vena jugularis eine Blutprobe entnommen und das daraus gewonnene Blutserum auf Na, K, Ca und Mg nach der *Kramer-Tisdall*schen Methode untersucht. Ferner wurde die CO_2-Kapazität des Gesamtblutes, das mit einer Gasmischung, bestehend aus 5,5 Proz. CO_2 und 94,5 Proz. atmosphärischer Luft, ins Gleichgewicht gebracht war, nach der *Barcroft*schen Methode bestimmt. Einige Tage später erhielten die Hunde 6 ccm n/3 HCl pro Kilogramm Körpergewicht intravenös; eine halbe Stunde später wurde die zur Analyse erforderliche Blutmenge aus der Vena jugularis entnommen. *Die Resultate dieser Versuche finden sich in Tabelle I.* (Die Kationen sind in g/Mol/Liter berechnet, die CO_2-Kapazität in Prozenten.)

Tabelle I.

	Hund I		Hund II		Hund III	
	Normal	HCl-Inj.	Normal	HCl-Inj.	Normal	HCl-Inj.
CO_2-Kap.	73,20	55,70	77,00	63,50	83,50	88,60
Na	1,350	1,270	1,523	1,427	1,570	1,566
K	0,057	0,083	0,056	0,046	0,052	0,043
Ca	0,029	0,032	0,027	0,030	0,034	0,031
Mg	0,011	0,005	$0{,}004_5$	0,007	$0{,}008_6$	0,009
Sa.:	1,447	1,390	1,610	1,510	$1{,}664_6$	1,649

Es ergibt sich daraus zunächst einmal, daß in allen Versuchen die Summe der Kationen nach der Injektion geringer ist als vorher; und zwar ist dieser Unterschied deutlich in den ersten beiden Versuchen, sehr gering, wohl noch in der Fehlergrenze, im dritten Versuch. In diesem ist aber die CO_2-Kapazität schon wieder normal oder sogar übernormal geworden. Mit anderen Worten: Die Säuerung des Blutes ist bereits wieder ausgeglichen. Was die einzelnen Kationen anbelangt, so zeigt sich die Verminderung namentlich im Natriumgehalt sehr deutlich, während die übrigen Kationen schon wegen der geringen Menge, in der sie im Blute vorkommen, nicht so von Bedeutung sind.

Wir werden uns also vorstellen müssen, daß durch die HCl ein Teil der CO_2 aus dem Blute verdrängt und durch die Lungen abgedunstet wird, daß das sich bildende NaCl schnell im Urin zur Ausscheidung gelangt und auf diese Art das Na und der Gesamtkationengehalt des Blutes verringert wird.

Wir haben nun versucht, diese neu gefundenen Tatsachen dazu zu benutzen, um Aufschluß zu bekommen über das Symptombild, das sich bei Hunden nach der Nebennierenexstirpation entwickelt

und das in früheren Arbeiten unseres Instituts von *Bornstein* und *Holm*[1]) und von *Bornstein* und *Gremels*[2]) beschrieben worden ist.

Es war in diesen Versuchen gefunden worden, daß die Hunde nach Entfernung der Nebennieren unter starker Überventilation der Lungen zugrunde gehen, und es war die Frage aufgeworfen worden, ob diese Überventilation durch eine Acidose hervorgerufen sei oder als eine Reizung des Atemzentrums Veranlassung zu einer Alkalose geben würde. Falls es sich um eine Acidose handeln würde, würden wir zu erwarten haben, daß nach der Entfernung der Nebennieren sich in ähnlicher Weise eine Verschiebung der Kationen des Blutes zeigen würde, wie wir sie hier beschrieben haben.

Methodik.

Es wurde in der üblichen Weise Hunden die Nebennieren in Äthernarkose durch Laparatomie entfernt, nachdem einige Tage vorher eine Blutprobe aus der Vena jugularis entnommen und analysiert war. Kurz vor dem Tode der Tiere wurde eine zweite Blutprobe entnommen, analysiert und mit der ersten verglichen.

Die Resultate der Nebennierenversuche zeigt die Tabelle II.

(Im ersten Versuch fehlt die Bestimmung von K und Mg, im zweiten und dritten Versuch die Bestimmung vom Mg.)

Tabelle II.

	Hund I		Hund II		Hund III		Hund IV	
	Normal	Oper.	Normal	Oper.	Normal	Oper.	Normal	Oper.
CO_2-Kap. . . .	—	—	—	—	—	—	83,50	61,70
Na	1,298	1,400	1,320	1,370	1,360	1,480	1,570	1,575
K	—	—	0,074	0,082	0,056	0,097	0,052	0,067
Ca	0,026	0,038	0,029	0,032	0,037	0,039	0,034	0,030
Mg	—	—	—	—	—	—	$0{,}008_6$	0,010
Sa.:	1,324	1,438	1,423	1,484	1,453	1,616	$1{,}664_8$	1,682

Im vierten Versuch, dem einzigen, in dem die CO_2-Kapazität bestimmt wurde, findet sich ein starkes Sinken derselben, wie es auch von *Bornstein* und *Holm* (s. oben) beobachtet worden ist. Was die Kationen des Blutes anlangt, so findet sich ein Verhalten, das dem bei den Säurevergiftungsversuchen gefundenen absolut entgegengesetzt ist. Aber auch hier ist es der Natriumgehalt, der sich besonders stark und gleichsinnig geändert hat, nur dieses Mal im Sinne einer Zunahme.

Wir haben es hier also jedenfalls nicht mit einer Acidose, sondern mit einer Alkalose zu tun. Es entspricht dieses den Schlüssen, die

[1]) *Bornstein* und *Holm*, Zeitschr. f. exper. Med. **37**, 1.
[2]) *Bornstein* und *Gremels*, Virchows Arch. **254**, 409.

Bornstein und *Holm* in ihrer Arbeit über die Nebennierenexstirpation aus der Acidität und dem NH_3-Quotienten des Harns gezogen haben und nach denen sie ebenfalls die Überventilation nach Nebennierenentfernung als Ursache eines alkalotischen Symptomkomplexes ansahen.

Zusammenfassung.

1. Bei der experimentellen Acidosis des Hundes nach intravenöser Injektion von HCl findet sich im Serum ein Sinken des Gehalts an anorganischen Kationen, insbesondere des Natriums.

2. Nach Exstirpation der Nebennieren des Hundes findet sich eine Zunahme der Summe der Kationen im Serum, insbesondere des Natriums. Es wird daraus geschlossen, daß durch Nebennierenexstirpation eine Alkalose hervorgerufen wird.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XVI. Mitteilung:

Glykolyse und Glykometamorphose, unter besonderer Berücksichtigung des Insulins[1]).

Von

Theodor Brugsch und **Hans Horsters.**

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wir schlagen vor, den Ausdruck **Glykolyse** *nur noch für die Zerlegung des Zuckers in Milchsäure zu reservieren, den Ausdruck* **Glykooxydation** *für den oxydativen Abbau des Zuckers bzw. seines glykolytischen Spaltprodukts der Milchsäure zu verwenden und den Ausdruck* **Glykometamorphose** *für die den Zuckeraufbau bewirkenden synthetischen Prozesse, zu dem naturgemäß die Bildung eines Zuckerphosphorsäureesters gehört.* Will man den gesamten Abbau und Aufbau, wie es etwa durch das *Meyerhof*sche Schema repräsentiert wird, umschreiben, so mag man ihn Kohlehydratkreisprozeß oder kürzer **Kohlehydratzirkel** benennen.

In diesem Sinne befaßt sich der Inhalt vorliegender Mitteilung mit dem Problem der Glykolyse und der Glykometamorphose, wobei das Insulinproblem seine entsprechende Würdigung erfährt. Wir haben in den früheren Mitteilungen zeigen können, daß das Insulin zwar in großen Dosen die Sauerstoffatmung des Muskels zu aktivieren vermag, daß aber diese Dosen unphysiologisch hohe sind, *so daß man bei Übertragung dieser Versuche auf den lebenden Organismus nicht zu der Annahme berechtigt ist, die Wirkung des Insulins beruhe auf einer Aktivierung der Glykooxydation. Ebensowenig ist die Annahme möglich, daß die Wirkung des Insulins in einer Aktivierung der Glykolyse in vivo beruhe.* Aus diesen beiden Faktoren heraus ist die Erklärung der Insulinwirkung

---

[1]) Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit ist auszugsweise in der Berl Med. Gesellschaft am 16. Dezember 1925 vorgetragen und in der Med. Klinik 1926, Nr. 3 veröffentlicht worden.

am lebenden Objekt nicht möglich. Wir haben dagegen zeigen können, daß die Insulinwirkung in *einer Aktivierung der Glykometamorphose* besteht, und zwar speziell in einer Aktivierung des Zuckerphosphorsäureveresterungsprozesses; wir bezeichneten in unseren früheren Arbeiten das Insulin als Coferment der Phosphatese. Dagegen haben *v. Euler* und *Myrbäck*[1]) Einspruch erhoben: da Insulin bei der cofermentfreien Hefe die Cozymase nicht zu ersetzen vermag, so halten die Autoren unsere Ansicht, daß das Insulin das thermostabile Coenzym der Phosphatese, d. h. der Aktivator oder die Kinase der thermolabilen Phosphatese sei, mit der erwiesenen Tatsache nicht vereinbar. Diese Unstimmigkeit muß ohne weiteres zugegeben werden; aber abgesehen davon, daß wir selbst in der von den Autoren angezogenen Publikation folgende Ausführungen[2]) gemacht haben, also dasselbe aussagen, was die Autoren in ihrer Arbeit beweisen,

„Es gelingt nämlich, wie *Gottschalk* und *Neuberg* zeigen konnten, die Hefegärung statt mit Hefekochsaft mit Muskelkochsaft zu aktivieren, das gleiche gelingt aber nicht (wie wir in Bestätigung von *Fürth* sagen müssen) mit dem Insulin. Das Insulin ist also nicht identisch mit der Hefekinase und dem Coferment der Muskulatur, *es ist vielmehr spezifisch, und zwar anscheinend für die ganze Reihe der Warmblüter.*"

handelt es sich hier nur um einen reinen Begriffs- oder Wortstreit. *v. Euler* und *Myrbäck* sprechen von *Cozymase*, also von dem Coferment der Zymophosphatese, wir sprechen von Coenzym oder Coferment der Phosphatese, wobei wir den Hexosephosphorsäureester des tierischen Körpers im Sinne haben. Nun nehmen die Autoren allerdings an, daß dieser Zuckerphosphorsäureester, den *Embden* und Mitarbeiter Lactacidogen genannt haben, identisch mit dem Zymophosphat der Gärung sei. Wir müssen zugeben, daß wir anfangs diese Annahme auch gemacht haben und erst im Verlauf der Untersuchungen zu der Überzeugung gekommen sind, *daß eine solche Identität nicht besteht.* Unter diesem Gesichtspunkt ist sofort die Lösung des scheinbaren Widerspruchs gegeben. Die Muskelphosphatese ist eine andere als die Hefephosphatese. (vgl. XVII. Mitteilung). Um aber in der Literatur weitere Unstimmigkeiten zu vermeiden, wollen wir die Muskelhexosephosphorsäure als Myo-Hexosephosphorsäure oder abgekürzt Myophosphat im Gegensatz zur Zymo-Hexosephosphorsäure bezeichnen, wobei es zweckmäßig sein wird — solange nicht die Idendität des Zymophosphats mit dem bei der Milchsäuregärung gebildeten Hexosephosphatsäureester festgestellt ist —, auch von einem Lactophosphat zu sprechen. Das Coenzym des Myophosphats ist nicht identisch mit dem Coenzym des Zymophosphats,

[1]) *Hans v. Euler* und *Karl Myrbäck*, Hoppe-Seyler **150**, 1, 1925.

[2]) *Brugsch* und *Horsters*, Das Insulinproblem. Klin. Wochenschr. **4**, Nr. 10, 1925.

dagegen ist das Coenzym des Myophosphats (= Insulin) auch der Aktivator des Lactophosphats[1]), wenigstens für Bact. casei (*Virtanen*).

Wir haben nun in Erweiterung früherer Arbeiten hier den Versuch gemacht, die Beziehungen zwischen Glykolyse einerseits und Glykometamorphose andererseits aufzufinden, wobei wir als Glykometamorphose methodisch die Bildung des Hexosephosphorsäureesters zu bestimmen versuchten. Zur quantitativen Erfassung bedienten wir uns folgender Methodik.

Methodik.

Es werden Organbreie (Muskulatur, Leber, Niere) eines eben getöteten Tieres (Meerschweinchen, Kaninchen, Hund) nach gehöriger Zerkleinerung aufgeschwemmt im Verhältnis von 10 : 100. Zur Aufschwemmung werden Phosphatlösungen verschiedener Konzentration und verschiedener p_H und wechselnder Zucker- (Glucose-) konzentration benutzt. Die Organe werden 1 bis 2 Stunden bei 40° C teils mit[2]) teils ohne Durchlüftung belassen. Die Zuckerbestimmungen geschehen nach Enteiweißung (durch Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure) mittels der Bestimmung nach *Folin-Wu* bzw. *Hagedorn-Jensen*. Es wird sodann eine polarimetrische Bestimmung angeschlossen im 2-dm-Rohr (*Lippich*scher Dreischattenapparat; Fehler der Ablesung ± 0,02). Die Milchsäurebestimmung geschieht nach *Clausen-Meyerhof*, die Bestimmung des anorganischen Phosphats durch Magnesiafällung.

I. Versuche an der Muskulatur.

Versuch 1 (Nr. 68, Journ. IV).

Je 10 g frischer zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm 0,1 proz. Glucoselösung mit wechselnder Phosphatkonzentration versetzt (p_H 6,3). Der Drehungswinkel der Glukoselösung beträgt im 2-dm-Rohr + 0,1°. Der Versuch wird ohne Luftdurchleitung bei 40° C 90 Minuten lang durchgeführt.

Nach 90 Minuten	Drehung im 2-dm-Rohr	Glucose (Reduktionswert) mg-Proz.	Defizit mg-Proz.
0,1 proz. Glucoselösung ohne Phosphat . .	+ 0,08	98	2
0,1 „ „ mit 1 Proz. Phosphat	+ 0,08	82	18
0,1 „ „ „ 2 „ „	+ 0,08	69	31
0,1 „ „ „ 3 „ „	+ 0,06	66	34
0,1 „ „ „ 4 „ „	+ 0,04	88	12
0,1 „ „ „ 5 „ „	+ 0,00	90	10

Aus diesem Versuch läßt sich ableiten, daß — wie bereits *Meyerhof* schon an der Muskulatur erwiesen hat — Glykolyse ohne Phosphatzusatz nicht stattfindet. Bei Phosphatzusatz liegt das Maximum der Glykolyse bei 3 Proz. Phosphat. Im Gegensatz dazu ist ein Abfall der

[1]) Vgl. *Virtanen*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 58, 696, 1925.
[2]) Luftschüttelung im Thermostaten.

Rotation bei zunehmender Phosphatkonzentration zu konstatieren. Die Drehungskurve und die Reduktionskurve kommen weder zur Deckung, noch haben sie einen gleichen Verlauf (s. Kurve 1).

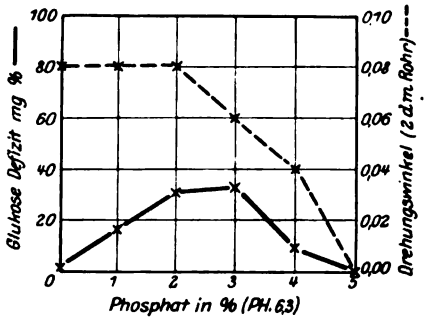


Abb. 1.

Versuch 2 (Nr. 72, Journal IV).

Je 10 g frischer, zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm mit einer 3proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) und Glucoselösung wechselnder Konzentration versetzt und ohne Durchlüftung bei 40° C belassen. Dauer des Versuchs 1 Stunde.

Konzentration der Glucoselösung	Wiedergefundene Glucose, berechnet nach dem Reduktionswert mg-Proz.	Defizit mg
0,2 proz.	189	11
0,4 „	380	20
0,6 „	591	9
0,8 „	789	11
1 „	1000	0

Versuch 3 (Nr. 73, Journal IV).

Der gleiche Versuch wie Nr. 2. Dauer des Versuchs 1 Stunde.

Konzentration der Glucoselösung	Wiedergefundene Glucose, berechnet nach dem Reduktionswert mg-Proz.	Defizit mg
0,2 proz.	195	5
0,4 „	362	38
0,6 „	583	17
0,8 „	780	20
1 „	990	10

Das Maximum der Glykolyse liegt, beim Vergleich schwächerer und stärkerer Zuckerlösungen und 3proz. Phosphatzusatz bei 0,4 Proz.; über diesen Wert hinaus nimmt die Glykolyse ab.

Wir haben nunmehr die p_H-Konzentration der zugesetzten Phosphatlösung wechseln lassen.

Versuch 4 (Nr. 67, Journal IV).

Je 10 g frischer, zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm etwa 0,1 proz. Glucoselösung mit 3 Proz. Phosphat von verschiedener p_H-Konzentration versetzt und bei 40° C 90 Minuten ohne Durchlüftung belassen. Der Drehungswert der Lösung beträgt + 0,12 (2-dm-Rohr), Reduktionswert = 0,112 Proz., berechnet auf Glucose.

p_H-Konzentration	α im 2-dm-Rohre	Glucose, berechnet aus der Reduktion mg-Proz.	Defizit mg
4,7	+ 0,1	63	49
6,3	+ 0,08	47	65
7,0	+ 0,06	51	61
8,4	— 0,02	53	59

Das Defizit ist am größten bei 6,3 p_H; doch ist zwischen p_H 4,7 bis 8,4 überall Glykolyse zu konstatieren.

Im Gegensatz zur Glykolysekurve verläuft die Drehungskurve völlig anders; sie stürzt mit abnehmender p_H-Konzentration ins Negative.

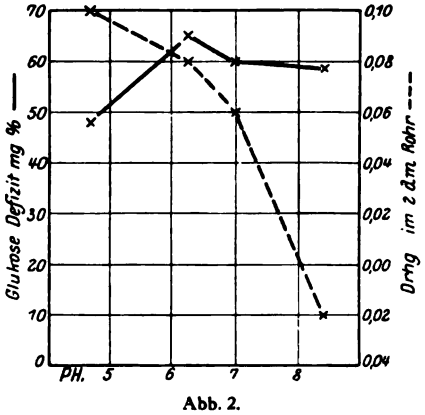


Abb. 2.

Aus unseren vier eben angeführten Versuchen dürfen wir schon den Schluß ziehen, daß die Rotationskurve der Zuckerlösung einen völlig anderen Verlauf nimmt als die Glykolysekurve, die aus der Änderung des Reduktionswertes erschlossen worden ist. Während im anoxybiotischen Versuch das Maximum der Glykolyse bei einer Zuckerkonzentration von 0,3 bis 0,4 Proz. Glucose liegt, ferner das Optimum der Glykolyse bei einer Phosphatkonzentration von 3 Proz. und einer p_H-Konzentration von 6,3, sind die tiefsten Rotationswerte erst bei höheren Phosphatkonzentrationen zu finden, ferner bei abnehmender p_H-Konzentration.

Wir haben nunmehr, um die Bedeutung des Drehungsabfalles erschließen zu können, die Beziehungen zwischen Rotation und Reduktion bei höheren Glucosekonzentrationen studiert.

Versuch 5 (Nr. 80, Journal IV).

Je 10 g frischer Meerschweinchenmuskel, fein zerschnitten, werden zu 100 ccm etwa 0,5 Proz. Glucose und 3proz. Phosphatlösung von wachsender p_H versetzt und bei 40° C ohne Durchlüftung belassen Dauer des Versuchs 70 Minuten. α der Lösung (2-dm-Rohr) = + 0,6°, Reduktionswert der Lösung = 0,568 Proz. Glucose.

p_H-Konzentration	α im 2-dm-Rohre	Glucosekonzentration, nach der Reduktion mg-Proz.	Glukose-defizit mg-Proz.
4,7	+ 0,48	545	23
6,3	+ 0,50	534	34
7,0	+ 0,40	540	28
8,4	+ 0,36	539	29

Die Glykolyse ist noch am größten bei p_H 6,3; der Abfall des Drehungswinkels nimmt mit abnehmender p_H zu.

Versuch 6. Glykolyseversuch (Nr. 103, Journal IV).

Je 10 g frischer, fein zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm mit 0,5 Proz. Glucose und 3 Proz. Phosphat wechselnder p_H-Konzentration gesetzt und bei 40° C ohne Durchlüftung belassen. Dauer des Versuchs 60 Minuten.

p_H	Reduktionswert, berechnet auf Glucose nach 60 Minuten Proz.	Defizit mg	p_H	Reduktionswert, berechnet auf Glucose nach 60 Minuten Proz.	Defizit mg
6,3	0,480	20	6,7	0,488	12
6,4	0,470	30	6,8	0,490	10
6,5	0,483	17	6,9	0,495	5
6,6	0,485	15	7,0	0,498	2

Resultat: Zwischen p_H 6,3 bis 6,7 liegen die niedrigsten Reduktionswerte, das Maximum der Glykolyse bei p_H 6,3 bis 6,4.

Versuch 7 (Nr. 63, Journal IV).

Je 10 g frischer, zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm etwa 1 Proz. Glucose und 3 proz. Phosphatlösung von wechselnder p_H bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

p_H-Konzentration	Drehungswinkel im 2-dm-Rohre		
	in der Lösung vor dem Versuch	nach 60 Minuten	nach 90 Minuten
4,7	+ 0,98	+ 0,92	+ 0,90
6,3	+ 1,00	+ 0,90	+ 0,90
7,0	+ 1,00	+ 0,88	+ 0,84
8,4	+ 1,02	+ 0,82	+ 0,82

Das Maximum des Drehungsabfalls liegt bei der niedrigsten p_H-Konzentration.

Versuch 8 (Nr. 54, Journal IV).

Je 10 g **frischer** Meerschweinchenmuskel, zerschnitten, werden zu 100 ccm etwa 1 proz. Glucoselösung, der wechselnde Mengen Phosphat (p_H 6,3) zugesetzt sind, gebracht und bei 40° C ohne jeden Zusatz belassen; es wird der Drehungswinkel der Zuckerlösung nach 30, 60 und 90 Minuten bestimmt. Der Drehungswert der α-β-Glucoselösung vor dem Zusatz der Muskulatur beträgt = 0,50° im 1-dm-Rohr.

	Drehungswinkel im 1-dm-Rohr		
	nach 30 Min.	nach 60 Min.	nach 90 Min.
Ohne Phosphatzusatz	0,46°	0,46°	0,46°
Mit 1 Proz. Phosphatzusatz . . .	0,46	0,45	0,45
„ 2 „ „ . . .	0,45	0,45	0,44
„ 3 „ „ . . .	0,44	0,44	0,43
„ 4 „ „ . . .	0,42	0,43	0,42
„ 5 „ „ . . .	0,42	0,42	0,42

Resultat: Mit zunehmender Phosphatlösung Abnahme der Drehung.

Versuch 9 (Nr. 57, Journal IV).

Je 10 g frischer Meerschweinchenmuskel, zerschnitten, werden zu 100 ccm etwa 1proz. Glucoselösung mit wechselnder Phosphatmenge gebracht und bei 40° C ohne jeden Zusatz belassen. Der Drehungswinkel der Glucoselösung vor dem Phosphatzusatz beträgt 0,51° im 1-dm-Rohr.

	Drehungswinkel im 1-dm-Rohr	
	nach 60 Min.	nach 90 Min
Ohne Phosphat	0,47°	0,46°
Mit 1 Proz. Phosphat	0,43	0,44
„ 4 „ „	0,39	0,37

Resultat: Stetige Abnahme des Drehungswinkels der Glucoselösung durch den Phosphatzusatz.

Versuch 10 (Nr. 60, Journal IV).

Je 10 g frischer zerschnittener Meerschweinchenmuskel eines im hypoglykämischen Komplex durch Insulin befindlichen Tieres werden zu 100 ccm etwa 1proz. Glucoselösung mit wechselndem Phosphatzusatz gebracht und bei 40° C ohne Durchlüftung belassen. Der Drehungswinkel der Glucoselösung beträgt im 1-dm-Rohr = 0,53°.

	Drehungswinkel im 1-dm-Rohr	
	nach 60 Min.	nach 90 Min.
Ohne Phosphat	0,48°	0,48°
Mit 1 Proz. Phosphat	0,47	0,48
„ 2 „ „	0,45	0,47
„ 3 „ „	0,47	0,45
„ 4 „ „	0,43	0,41
„ 5 „ „	0,45	0,38

Resultat. Mit zunehmendem Phosphatzusatz Abnahme der Drehung der Glucoselösung.

Es zeigt sich also auch bei höherer Zuckerkonzentration (0,5 bis 1 Proz. Glucose) die Abnahme des Drehungswinkels zunehmend mit der Phosphatkonzentration und mit der Abnahme der p_H-Konzentration.

Aus der Tatsache, daß der Drehungsabfall nicht den Gesetzmäßigkeiten der Glykolyse (beurteilt nach den Abfall der Reduktion) im

anoxybiotischen Versuch folgt, ist zunächst der eine Schluß erlaubt, daß wir es mit einem von der Glykolyse weitgehend unabhängigen Vorgang zu tun haben, der in einer Änderung des Zuckercharakters begründet sein muß. Dieser Frage haben wir uns nunmehr zuwenden müssen.

Wir hatten für unsere Versuche 1 bis 10 jeweils eine α-β-Glucoselösung gewählt, deren Drehungswert also stabil war. Es wäre nun nach dem Stande unserer heutigen Kenntnisse durchaus möglich, daß durch die Phosphatlösung an sich eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen α- und β-Glucose zustande kommt, bzw. daß durch das Phosphation Umlagerungen in der Richtung auf linksdrehende Zucker geschehen, ähnlich wie durch stark alkalische Lösungen solche Reaktionen im Sinne der *Lobry de Bruyn*schen Reaktion zustande kommen. Dafür könnte auch herangezogen werden, daß bei p_H 8,4 der geringste Drehungswert zu finden ist. Es läßt sich indessen leicht durch einen Versuch zeigen, daß weder Phosphatkonzentrationen bis 5 Proz. Phosphat, wie sie in unseren Versuchen Verwendung fanden, noch auch eine p_H-Konzentration von 8,4 imstande sind, eine Mutarotation zu bewirken, wobei wir bemerken, daß wir die biologischen Versuche nicht länger als höchstens 2 Stunden, meist ja nur 1 Stunde, durchgeführt haben, während sich auch nach 6, 12, 24 Stunden keine Mutarotation an einer reinen entsprechenden Zuckerphosphatlösung ergab. Wir sehen von der Anführung dieser Versuche hier ab, um so mehr, als ein Versuch an einem Trockenmuskelpräparat, das wir für unsere Phosphataseversuche zu benutzen pflegen, *keine* Änderung der Drehung ergibt. Es beweist der nunmehr folgende Versuch, daß also nur der frische Muskel imstande ist, eine Mutarotation in der Glucoselösung bei Gegenwart von Phosphat hervorzurufen.

Versuch 11 (Nr. 56, Journal IV).

Je 10 g **Trockenmuskel** vom Hund, fein zerrieben, werden zu 100 ccm etwa 1proz Glucoselösung mit wechselnder Phosphatmenge (p_H 6,3) gebracht und die Aufschwemmung bei 40° C belassen; der Drehungswert der α-β-Glucoselösung beträgt vor dem Zusatz 0,51° (1-dm-Rohr).

	Drehungswinkel im 1-dm-Rohr		
	sofort	nach 60 Min.	nach 120 Min.
Ohne Phosphat	0,49°	0,49°	0,49°
Mit 1 Proz. Phosphat	0,49	0,50	0,49
„ 3 „ „	0,49	0,49	0,49
„ 5 „ „	0,50	0,50	0,51

Resultat: Der Trockenmuskel bewirkt *keine* Drehungsabnahme in der Glucoselösung trotz Phosphatzusatzes.

Mit der Feststellung, daß wir es nicht mit einem der *Lobry de Bruyn*schen Reaktion analogen, durch das Phosphation bedingten sterischen Umlagerungsvorgang zu tun haben, sind wir dann weiter zu der Frage geschritten, ob denn nicht etwa die Möglichkeit bestände, hier den Drehungsabfall auf die Bildung einer sogenannten γ-Glucose zu beziehen. Diese Frage ist ja insbesondere vom Insulinstandpunkt aus viel diskutiert worden, und *Lundsgaard* hat am Muskel mit seinen Versuchen die Bildung einer Neo-Glucose unter dem Einfluß des Insulins annehmen zu können geglaubt. Die Ergebnisse *Lundsgaards* basieren auf dem Nachweis einer Drehungsherabsetzung gegenüber dem Reduktionswert an einer dialysierten Zuckerlösung aus einer Muskelzuckersuspension, die unter dem Einfluß von Insulin gestanden hat. Wir möchten hier nicht in eine Kritik der *Lundsgaard*schen Arbeit spezieller Art eintreten, sondern verschieben das auf eine spätere Mitteilung; wir möchten nur hier bemerken, daß die tatsächlichen Beobachtungen *Lundsgaards* sich besser durch unsere Deutung erklären lassen, daß der Drehungsabfall nicht durch eine Neo- bzw. γ-Glucosebildung bedingt wird, sondern durch eine — wie wir vorwegnehmen wollen — Veresterung des Zuckers mit der Phosphorsäure.

Diese Veresterung könnte — und damit kann man *Lundsgaards* Hypothese akzeptieren — als Voraussetzung die Umwandlung einer α-β-Glucose in eine γ-Glucose haben; was aber den Drehungsabfall effektiv bewirkt, ist nicht die unstabile γ-Glucose, sondern die Veresterung dieser mit der Phosphorsäure zu einer stabilen Verbindung. Daß die durch die Muskulatur bewirkte Mutarotation der Glucoselösung bei Anwesenheit von Phosphat nicht in dem Auftreten eines geänderten sterischen Zuckers liegt, sondern auf der Bildung eines linksdrehenden Zuckerphosphorsäureesters beruht, läßt sich durch folgenden Versuch einfach aufzeigen. Bekanntlich bewirkt Bleiacetat keine Fällung der Hexosen. Wir haben nunmehr folgenden Versuch durchgeführt:

Versuch 12 (Nr. 116, Journal IV).

20 g frischer, zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden mit 200 ccm 0,5 proz. Glucose- und 3 proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) versetzt.

	Drehungswert im 1-dm-Rohr	
		nach Bleifällung
Sofort	0,20°	0,22°
Nach 30 Minuten	0,16	0,19
„ 60 „	0,12	0,20

Resultat: In der Aufschwemmung befindet sich eine linksdrehende Substanz, die durch Bleiacetat ausgefällt wird; die linksdrehende

Substanz vermehrt sich im Laufe des Versuchs; es gelingt, im Bleiniederschlag nach Zersetzung durch Schwefelwasserstoff die linksdrehende Substanz aufzuweisen.

Es ist also die Abnahme der Drehung nur durch das Auftreten seine linksdrehenden Körpers bedingt worden, der, wie unsere weiteren Untersuchungen ergeben haben, ein linksdrehender Zuckerphosphorsäureester ist. Mit dieser Feststellung war für uns die Frage der Mutarotation geklärt. *Die Abnahme der Drehung beruht auf Glykometamorphose, d. h. Bildung eines Zuckerphosphorsäureesters. Die Glykometamorphose ist weitgehend unabhängig von der Glykolyse; die Glykometamorphose wird durch Phosphatkonzentration und Abnahme der p_H-Konzentration begünstigt; sie ist anoxybiotisch zu bewirken, ist aber an die Frische des Präparats gebunden, d. h. sie ist nicht mit einem Trockenmuskelpräparat, wenigstens unserer Herstellung, zu erzielen.*

Wir müssen unserer XVII. Mitteilung die Einzelheiten des präparativen Vorgehens zur Erfassung der Verbindung vorbehalten und können hier nur noch bemerken, daß wir mit der Feststellung der Abnahme der Drehung eine Methode haben, die uns experimentell unter geeigneten Versuchsbedingungen (starker Einschränkung der Glykolyse durch Wahl hoher Zuckerkonzentration und hoher Phosphatkonzentration) die Möglichkeit an die Hand gibt zur Verfolgung der Glykometamorphose. Eine zweite Möglichkeit ist uns, wie bekannt, durch die Bestimmung der anorganischen — PO_4 gegeben. Ehe wir nun zu den näheren Bedingungen der Glykometamorphose übergehen, mögen hier noch eine Reihe von Beobachtungen Platz finden, die sich mit einigen Bedingungen der Glykolyse der Muskulatur befassen.

Versuch 13 (Nr. 96, Journal IV).

Je 10 g fein zerschnittener, frischer Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm 3proz. Phosphat- (p_H 7) und 0,5proz. Glucoselösung (verschiedener Glucosen) versetzt und bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

	Reduktionswert (berechnet als Glucose)		
	nach 30 Min. mg-Proz.	nach 60 Min. mg-Proz.	nach 90 Min. mg-Proz.
Bei α-Glucose	485	472	470
„ β-Glucose	—	490	488
„ α-β-Glucose	480	—	470

Die Unterschiede in dem Ergebnis sind so minimale, daß man kaum einen prinzipiellen Unterschied in Glykolyse der verschiedenen Glucosen herauslesen kann.

Wir haben sodann noch einige Versuche über den Einfluß von KCl und $CaCl_2$, ferner von NaF auf die Glykolyse angestellt.

Versuch 14 (Nr. 98, Journal IV).

Je 10 g frischer, fein zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm mit 0,5proz. Glucoselösung und KCl wechselnder Konzentration versetzt und bei 40° C belassen.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose	
	nach 30 Min. Proz.	nach 60 Min. Proz.
0,1 KCl auf 100 ccm	0,483	0,465
0,2 „ „ 100 „	0,490	0,490
0,3 „ „ 100 „	0,490	0,475
0,4 „ „ 100 „	0,510	0,498
0,5 „ „ 100 „	0,505	—

Resultat: Bis zu 0,3 Proz. KCl ist eine Abnahme der Reduktionswerte zu verzeichnen, d.h. jenseits von 0,3 Proz. KCl hört die Glykolyse auf.

Versuch 15 (Nr. 99, Journal IV).

Statt KCl der gleiche Versuch mit wechselndem $CaCl_2$.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose	
	nach 30 Min. Proz.	nach 60 Min. Proz.
0,1 $CaCl_2$ auf 100 ccm	0,493	0,500
0,2 „ „ 100 „	0,483	0,474
0,3 „ „ 100 „	0,490	0,493
0,4 „ „ 100 „	0,495	0,520
0,5 „ „ 100 „	—	0,500

Resultat: Von 0,4 Proz. ab ist keine Änderung des Reduktionswertes zu verzeichnen; die Konzentration von 0,2 Proz. ergibt den niedrigsten Reduktionswert; jenseits von 0,3 Proz. $CaCl_2$ erlischt die Glykolyse.

Versuch 15 (Nr. 100, Journal IV).

Je 10 g frischer Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm mit 0,5proz. Glucoselösung, der wechselnde Mengen NaF zugesetzt sind, versetzt und bei 40° C belassen.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose	
	nach 30 Min. Proz.	nach 60 Min. Proz.
m/20 NaF	0,488	0,478
m/10 „	0,492	0,478
m/5 „	0,480	0,483
m/3 „	0,485	0,474

Resultat: Ein Einfluß des NaF auf Glykolyse ist bei verschiedenen NaF-Konzentrationen nicht feststellbar.

Wir haben uns nunmehr, nachdem wir die weitgehende Unabhängigkeit der Glykolyse von der Glykometamorphose festgestellt hatten, der Frage zugewandt, inwieweit das Insulin bei der Muskulatur in die Glykolyse und in die Glykometamorphose eingreift, ferner auch der Frage, wieweit beide anoxybiotisch bzw. oxybiotisch durch Insulin beeinflußbar sind.

Versuch 16 (Nr. 106, Journal IV).

Je 10 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel werden zu 100 ccm mit 0,5proz. α-β-Glucose- und 3proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) versetzt, zu einer Portion 20 Einheiten Insulin *Kahlbaum* (trocken) zugefügt und bei 40° C ohne und mit Durchlüftung stehengelassen.

A. *Ohne* Insulin nach 60 Minuten Reduktionswert = 465 mg-Proz., Defizit = 35 mg.

B. Mit Insulin nach 60 Minuten Reduktionswert = 459 mg-Proz., Defizit = 41 mg.

Derselbe Versuch nur mit Durchlüftung.

A. Ohne Insulin nach 60 Minuten Reduktionswert = 435 mg-Proz., Defizit = 65 mg.

B. Mit Insulin nach 60 Minuten Reduktionswert = 444 mg-Proz., Defizit = 56 mg.

Es ergibt sich, daß das Defizit an Glucose annähernd das gleiche ist im anoxybiotischen Versuch mit und ohne Insulinzusatz, ebenso im oxybiotischen Versuch. Die Glykolyse ist größer im oxybiotischen Versuch, doch darf man das mechanische Moment der Durchlüftung (Schüttelung) nicht unterschätzen.

Gleiche Erfahrungen haben wir in einer Reihe weiterer Beobachtungen gemacht, von deren Anführung wir absehen.

Da wir in unseren bisherigen Versuchen, die anoxybiotisch durchgeführt worden sind, den Reduktionswert auf Glucose berechnet und das Defizit auf Glykolyse bezogen haben, was nicht ohne weiteres erlaubt ist, da ja auch die Möglichkeit besteht, daß der Hexosephosphorsäureester reduzierende Eigenschaften hat, so führen wir hier Versuche an, in denen das aus dem Reduktionswert erschlossene Glucosedefizit mit dem Milchsäurewert verglichen wird.

Versuch 17 (Nr. 114, Journal IV).

50 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel werden zu 200 ccm mit 0,5proz. α-β-Glucose- und 3proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) mit 10 Einheiten Insulin (*Kahlbaum*, trocken) versetzt und mit Luft 2 Stunden bei 40° C geschüttelt.

Reduktionswert der Lösung *vorher* 500 mg-Proz.
Milchsäurewert . . . . . 16,6 „
Reduktionswert der Lösung nachher 435 mg-Proz., Defizit 65 mg
Milchsäurewert . . . . . 18 „ Bilanz + 1,4 mg

Es zeigt sich also, daß der Abnahme des Reduktionswertes keine Glykolyse entspricht. *Es muß daher die Abnahme des Reduktionswertes die Folge der Glykometamorphose sein.* Es hat sich in diesem Versuch die Existenz eines linksdrehenden Hexosephosphorsäureesters nachweisen lassen.

Wir haben nunmehr in einer Reihe von Versuchen — als Maß der Bildung eines Hexosephosphorsäureesters — das Verschwinden anorganischer Phosphorsäure aus der Lösung verfolgt.

Zunächst haben wir einen Versuch anoxybiotisch durchgeführt.

Versuch 18 (Nr. 129, Journal IV).

40 g frischer, zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 400 ccm mit 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) versetzt und bei 40° C ohne Durchlüftung belassen. Zur Bestimmung der anorganischen $-PO_4$ werden jede halbe Stunde 2 ccm der freien Flüssigkeit entnommen, mit 4 ccm 2½ Proz. NH_3 versetzt, klar filtriert, vom Filtrat 3 ccm mit 5 ccm Magnesiamischung versetzt und der Rückstand vorschriftsmäßig geglüht.

	$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g		$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g
Freie Lösung nach Zusatz .	1,95	Nach 120 Minuten .	1,99
Nach 30 Minuten	2,07	„ 150 „ .	1,97
„ 60 „	2,17	„ 180 „ .	1,87
„ 90 „	2,07		

Es tritt eine Verminderung des anorganischen Phosphats ein, auch wenn diese nur gering benannt werden muß. Bedenkt man indessen, daß eigentlich erst in höheren Phosphatkonzentrationen (von 3 Proz. ab), wie unsere Versuche gelehrt haben, die aus der Mutarotation zu erschließende Glykometamorphose einsetzt, so erscheint dieser Versuch immerhin bedeutungsvoll.

Wir haben nun in der Anlage den gleichen Versuch oxybiotisch durchgeführt.

Versuch 19 (Nr. 127, Journal IV).

40 g frischer, fein zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden mit 400 ccm 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) bei 40° C unter Luft geschüttelt. Es wird jede halbe Stunde eine Probe entnommen zur Bestimmung der freien anorganischen $-PO_4$ (2 ccm der freien Flüssigkeit werden mit 4 ccm 2½proz. NH_3 versetzt, vom Filtrat 3 ccm mit 5 ccm Magnesiamischung versetzt und dann durch Glühen als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt).

	$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g		$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g
Sofort	1,85	Nach 90 Minuten	1,99
Nach 30 Minuten	1,87	„ 120 „	1,99
„ 60 „	1,95	„ 180 „	1,99

Es zeigt sich bei der gleichen Phosphatkonzentration bei der oxybiotischen Durchführung des Versuchs kein Verschwinden anorganischer $-PO_4$. Das könnte zu dem Schluß verleiten, daß die Oxybiose der Glykometamorphose nicht günstig sei, weil im Gegenteil hier eine Phosphatasewirkung überwiegt.

Wir haben indessen noch eine Anzahl von anoxybiotischen Versuchen durchgeführt, um nachzuweisen, ob in diesen Versuchen bereits bei einer 2proz. Phosphatkonzentration eine organische Phosphatsynthese die Regel ist.

Versuch 20 (Nr. 137, Journal IV).

40 g Meerschweinchenmuskel, frisch, fein zerschnitten, werden zu 400 ccm mit 0,5proz. Glucose- und etwa 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,7) versetzt und bei 40° C belassen (ohne Durchlüftung).

Phosphatbestimmung wie in den vorigen Versuchen.

	$Mg_2P_2O_5$ in 100 ccm g		$Mg_2P_2O_5$ in 100 ccm g
In der Suspension, sofort .	1,79	Nach 90 Minuten . . .	1,89
Nach 30 Minuten	1,77	„ 120 „ . . .	1,91
„ 60 „	1,77		

Es zeigt sich kein Verschwinden von anorganischem Phosphat, im Gegenteil eine geringe Zunahme, die als Phosphatasewirkung anzusprechen ist. Im Gegensatz dazu zeigt wieder der nächste Versuch ein Verschwinden von anorganischem Phosphat bei 2proz. Phosphatlösung.

Versuch 21 (Nr. 134, Journal IV).

20 g Meerschweinchenmuskel, frisch zerschnitten, werden zu 200 ccm mit 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) versetzt und bei 40° C belassen (ohne Durchlüftung). Phosphatbestimmung wie im vorigen Versuch.

	$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g		$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g
In der Suspension, sofort .	1,99	Nach 90 Minuten . . .	1,83
Nach 60 Minuten	1,75	„ 120 „ . . .	1,73

Es läßt sich zusammenfassend sagen, daß bei einer 2proz. Phosphatkonzentration und 0,5proz. Glucosekonzentration die Glykometamorphose keine regelmäßig nachweisbare Erscheinung bei den Versuchen mit Muskeln ist.

Diese Tatsache war für uns experimentell von Bedeutung, weil sie gestattet, nunmehr den Einfluß des Insulins auf die Glykometamorphose der Muskulatur zu demonstrieren. Da, wie in früheren Versuchen gezeigt worden war, das Insulin nur in unphysiologisch hohen Dosen die Atmung der Muskulatur aktiviert, da ferner das Insulin — wie ja auch unser Versuch 17 demonstriert — die Glykolyse nicht aktiviert,

so muß, wenn überhaupt das Insulin einen Einfluß auf den Kohlehydratzirkel des Muskels ausübt, sich hier der Einfluß geltend machen. Hierbei wurde ganz besonders das Problem beachtet, ob der Einfluß des Insulins in der oxybiotischen oder auch in der anoxybiotischen Phase sich geltend macht.

Versuch 22 (Nr. 154, Journal IV).

40 g frisch zerkleinerter Meerschweinchenmuskel werden zu 400 ccm 0,5proz. α-β-Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) und 30 Einheiten Insulin (trocken, *Kahlbaum*) versetzt und unter Toluolzusatz bei 40° C belassen.

	$Mg_2P_2O_7$ Proz.	Glucose, aus dem Reduktionswert bestimmt Proz.	Drehung im 2-dm-Rohr	Milchsäure mg-Proz.
Sofort	1,81	0,490	+ 0,52	12,2
Nach 1 Stunde . . .	1,61	0,480	+ 0,36	12,6
„ 3 Stunden . .	1,59	0,490	+ 0,34	19,0

Die Glykolyse (beurteilt nach dem Milchsäurezuwachs) ist minimal; der Reduktionswert hat sich nicht wesentlich geändert, dagegen fällt die Abnahme der Drehung mit der Abnahme der anorganischen Phosphorsäure zusammen; d. h. das Insulin hat elektiv nur die Glykometamorphose beeinflußt, dagegen nicht die Glykolyse. Vergleicht man die Werte kurvenmäßig, so fallen die Gesetzmäßigkeiten der Glykometamorphose deutlich auf.

Wir führen einen weiteren Versuch an, der das gleiche Ergebnis zeitigt.

Versuch 24 (Nr. 152, Journal IV).

20 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel werden zu 200 ccm mit 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3), ferner mit 30 Einheiten Insulin *Kahlbaum* (Trockenpräparat) versetzt und unter Toluolzusatz bei 40° C belassen (anoxybiotisch).

	$Mg_2P_2O_7$ Proz.	Drehungswinkel im 2-dm-Rohr
Sofort	1,81	+ 0,52
Nach 1 Stunde	1,63	—
„ 3 Stunden	1,71	—
„ 4 „	1,61	+ 0,20

Der Drehungsabfall ist nach 4 Stunden noch erheblich größer geworden, verglichen mit dem vorigen Versuche. Ebenfalls ist eine erhebliche Verminderung des anorganischen Phosphors eingetreten. Daß nun in den beiden letzten Versuchen die Verminderung der anorganischen Phosphorsäure wirklich auf den Insulineffekt zu beziehen ist, darüber belehrt ein Vergleich der Phosphorsäurekurven der Versuche 18, 19, 20, 21 einerseits und 22, 23 andererseits. Da überall eine 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3 bis 6,7) bei gleicher Glucosekonzentration zur Verwendung kam, ist ein Vergleich der Werte untereinander gestattet.

Versuch 23 (Nr. 140, Journal IV).

40 g frischer, fein zerschnittener Meerschweinchenmuskel werden zu 400 ccm mit 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) versetzt und bei 40° C belassen, ferner mit 30 Einheiten Insulin (trocken, *Kahlbaum*). Phosphatbestimmung wie in den vorigen Versuchen.

	$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g		$Mg_2P_2O_7$ in 100 ccm g
Freie Lösung	1,89	Nach 90 Minuten . . .	1,85
In der Suspension, sofort .	1,87	„ 120 „ . . .	1,87
Nach 30 Minuten	1,86	„ 150 „ . . .	1,59
„ 60 „	1,85	„ 180 „ . . .	1,47

Resultat: Von der zweiten Stunde ab erhebliche Abnahme der freien anorganischen PO_4.

Jedenfalls liegen die Insulinkurven der anorganischen Phosphorsäure erheblich tiefer als die anderen ohne Insulin, wobei die oxybiotisch durchgeführte Kurve nicht aus der Reihe der anderen, die anoxybiotisch durchgeführt sind, herausfällt.

Diese Beobachtungen des Verschwindens anorganischer $-PO_4$ unter dem Einfluß des Insulins bei der Muskulatur stellt eigentlich nur eine erweiternde Bestätigung unserer an der Leber (s. VIII. Mitteilung *Brugsch-Horsters*) festgestellten Beobachtung dar, aus der wir damals schon den Schluß zogen, daß das Insulin der Aktivator oder das Coferment einer Phosphatese sei. Jedenfalls kann hiernach schon die aktivierende Eigenschaft des Insulins auch für die Muskelphosphatese als bewiesen angesehen werden.

Wir geben nunmehr einen Versuch wieder, der darüber Aufschluß geben sollte, ob die Durchlüftung den Prozeß der Phosphorylierung wesentlich zu beeinflussen vermag, nachdem Insulin zu dem Versuchspräparat zugesetzt worden ist.

Versuch 24 (Nr. 159, Journal IV).

40 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel werden zu 400 ccm 0,5proz. Glucose- und 2proz. Phosphatlösung (p_H 6,3) und 30 Einheiten Insulin (Trockenpräparat *Kahlbaum*) versetzt und bei 40° C mit Luft geschüttelt.

	$Mg_2P_2O_7$ Proz.	Glucose (nach dem Reduktionswert) mg·Proz.	Drehung im 2-dm-Rohr	Milchsäure mg·Proz.
Sofort	1,57	470	+ 0,48	20,3
Nach 2 Stunden . . .	1,69	454	+ 0,46	52,6
„ 3 „ . . .	1,41	449	+ 0,38	59,8
„ 5 „ . . .	1,87	449	+ 0,46	57,0

Eine Phosphorylierung (Verschwinden von anorganischer PO_4) ist unverkennbar größer als unter den möglichen Bedingungen eines

insulinfreien Mediums. Auch eine entsprechende Mutarotation ist festzustellen. Das Defizit an Glucose ist im gewissen Grade durch die Zunahme der Milchsäure gedeckt. Daß nach 5 Stunden eine Zunahme des Drehungswinkels wie eine Zunahme des anorganischen Phosphats zu finden ist, beruht auf einer (autolytischen) Phosphatasewirkung. Im ganzen zeigt aber dieser Versuch im Vergleich mit den früheren anoxybiotisch durchgeführten Versuchen, *daß die Oxybiose keine Voraussetzung für die Wirksamkeit der Glykometamorphose, d. h. der Wirksamkeit der Myophosphatese ist.*

Wir sind nunmehr dazu übergegangen, den Versuch der Auswaschung des Coferments der Myophosphatese zu machen und diese dann wieder durch Insulin zu ersetzen. Dieser Versuch ist gelungen.

Versuch 25 (Nr. 161, Journal IV).

A.

Frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel wird im Schüttelapparat bei 20° 30 Minuten lang mit destilliertem Wasser gewaschen, danach vom Wasser durch Mull getrennt und 40 g zu 400 ccm mit 0,5proz. Glucoselösung, die 2 Proz. Phosphat (p_H 6,7) enthielt, aufgeschwemmt und ohne Durchlüftung bei 40° C mit Zusatz von 30 Einheiten Insulin-*Kahlbaum* (trocken) belassen.

	$Mg_2P_2O_7$ g-Proz.	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Milchsäure mg-Proz.
Sofort	2,07	429	0,5°	5,85
Nach 1 Stunde	2,13	429	0,42	9
„ 2 Stunden . . .	1,89	434	0,36	—
„ 3 „ . . .	1,75	434	0,38	10,3
„ 4 „ . . .	1,79	434	0,36	7,2
„ 5 „ . . .	2,09	429	0,32	6,75

Es zeigt sich sowohl an der Abnahme der Drehung wie an dem Verschwinden von anorganischer Phosphorsäure die Myophosphatese, während die Milchsäure- wie Reduktionswerte annähernd stabile sind; anders hingegen verläuft der gleiche Versuch an der gewaschenen Muskulatur *ohne* jeden Insulinzusatz.

B.

Der *gleiche* Versuch wie A, nur ohne jeden Zusatz von Insulin.

	$Mg_2P_2O_7$ g-Proz.	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Milchsäure mg-Proz.
Sofort	2,12	489	0,48	4,50
Nach 1 Stunde	1,97	465	0,44	6,30
„ 2 Stunden . . .	1,81	470	—	6,30
„ 3 „	1,61	453	0,44	6,75
„ 4 „	—	463	0,44	9,18
„ 5 „	1,63	461	0,44	11,25

Zwar ist hier auch eine Verminderung von anorganischem Phosphat noch zu konstatieren, die wohl nur auf einer Adsorption von Phosphorsäure an der ausgewaschenen Muskulatur beruht, aber der Drehungswinkel erfährt praktisch keine Abnahme. Die Glykolyse ist minimal, der Glucosewert höher als im vorigen Versuch, aber annähernd stabil. *Unzweifelhaft ist der Drehungsabfall unter dem Einfluß des Insulins im Verein mit dem Verschwinden anorganischer PO_4 ein Beweis für die Wirksamkeit des Insulins im Sinne der Cofermentnatur einer Myophosphatese, die aus der Muskulatur auswaschbar und durch Insulin ersetzbar ist.*

Wir haben weitere Versuche in diesem Sinne angestellt; wir führen zum Beleg folgenden Versuch an:

Versuch 26 (Nr. 165a, Journal IV).

Frisch zerkleinerter Meerschweinchenmuskel wird im Schüttelapparat mit destilliertem Wasser bei 20° eine halbe Stunde lang geschüttelt und nach der Waschung durch Mull abgepreßt.

40 g dieser gewaschenen Muskulatur werden zu 400 ccm mit 0,5proz. Glucoselösung, die 2 Proz. Phosphat (p_H 6,7) enthielt, aufgeschwemmt und ohne Durchlüftung bei 40° C mit Zusatz von 20 Einheiten Insulin (trocken, *Kahlbaum*) belassen.

	$Mg_2P_2O_7$ g-Proz.	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Milchsäure mg-Proz.
	A. Mit Insulin.			
Sofort	1,99	465	0,42°	4,9
Nach 1 Stunde	1,97	444	0,38	5,4
„ 2 Stunden	1,69	439	0,36	5,8
„ 3 „	1,65	389	0,34	7,2
„ 4 „	—	381	0,34	6,7
„ 5 „	1,91	460	0,30	6,7
	B. Ohne Insulin.			
Sofort	—	481	0,44°	5,8
Nach 1 Stunde	1,83	452	0,40	8,6
„ 2 Stunden	1,69	—	0,40	9,0
„ 3 „	1,80	470	0,40	—
„ 4 „	1,89	440	0,40	10,8
„ 5 „	1,81	460	0,40	14,0

Auch hier das gleiche Resultat, daß Auswaschen die Glykometamorphose zum Verschwinden bringt, während sie durch Insulin als Aktivator der Myophosphatese wieder aktiviert wird.

Zusammenfassung.

Fassen wir nun unsere Erfahrungen über Glykolyse und Glykometamorphose, die wir an der Warmblütermuskulatur gewonnen haben, zusammen unter Berücksichtigung der Rolle des Insulins, so kommen wir zu folgendem Ergebnis: *Wenn wir mit dem Ausdruck Glykolyse nur die Zuckerzerlegung der Glucose in Milchsäure verstehen, mit dem Ausdruck Glykometamorphose die Veresterung der Glucose unter Umbau dieser und unter Glykooxydation die Oxydation der Glucose oder ihres Spaltprodukts der Milchsäure, so vollzieht sich die Glykolyse in der Muskulatur — oxybiotisch wie anoxybiotisch — aus α-β-Glucose nur bei Gegenwart von Phosphat. Das Optimum der Glykolyse liegt etwa bei 3 Proz. Phosphat, ferner bei 0,3 bis 0,4 proz. α-β-Glucoselösung. Innerhalb einer vom Neutralitätspunkt nicht zu entfernten p_H-Konzentration liegt das Optimum bei p_H 6,3 bis 6,4. Die Glykolyse vollzieht sich kaum abweichend bei α-β-* oder *α-, β-Glucose. Höhere Konzentration als 0,3 Proz. KCl* und *0,4 Proz. $CaCl_2$ hemmen die Glykolyse. Ein wesentlicher Einfluß wechselnder Na F-Konzentrationen auf die Glykolyse war nicht zu konstatieren.*

Völlig von der Glykolyse zu trennen ist die Glykometamorphose; diese tritt ein unter Phosphatzusatz, wobei höhere Konzentrationen als 3 proz. und höhere Zuckerkonzentrationen diese Glykometamorphose begünstigen. Der Prozeß der Glykometamorphose wird aufgefaßt als Veresterung einer aus der Glucose entstehenden γ-Hexose mit Phosphorsäure, die linksdrehend ist (vgl. XVII. Mitteilung). Dadurch kommt es zur Mutarotation, d. h. zum polarimetrischen Drehungsabfall der Zuckerphosphatlösung. Die im Muskel durch den Veresterungsprozeß entstehende Hexosephosphorsäure wird im Gegensatz zur Harden-Youngschen Hexosephosphorsäure, die Zymophosphat benannt ist, mit **Myophosphat** *bezeichnet. Zymophosphat und Myophosphat werden* **als nicht identisch** *erklärt. Der Veresterungsprozeß beruht auf der Phosphatese der Muskulatur, die wirksam wird, sowohl oxybiotisch wie anoxybiotisch, bei Gegenwart von Zucker, Phosphorsäure und einem Coferment der Myophosphatese, das in den Muskeln enthalten ist, sich auswaschen läßt und durch Insulin ersetzen läßt. In diesem Sinne ist das Insulin identisch mit dem Coferment der Myophosphatese.*

Die Glykometamorphose ist weitgehend unabhängig von der Glykolyse; die Kurven der Glykometamorphose verlaufen nicht parallel mit denen der Glykolyse (über die Abhängigkeit der Glykolyse von der Glykometamorphose vgl. XX. Mitteilung).

Nach diesen Feststellungen über Glykolyse und Glykometamorphose bei der Muskulatur haben wir die entsprechenden Versuche an der Leber und der Niere durchgeführt.

II. Versuche an der Leber und an der Niere.

Versuch 27 (Nr. 71, Journal V).

A. Die Leber eines Meerschweinchens, das 20 Stunden gehungert hat, wird im Verhältnis von 1 : 10 fein emulsioniert aufgeschwemmt mit 0,3proz. α-β-Glucoselösung mit wechselndem Phosphatzusatz zwischen 1 bis 5 Proz. und p_H 7 und 90 Minuten ohne Durchlüftung bei 40° C belassen.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	Bilanz mg
Bei 1 Proz. Phosphat	267	— 33
„ 2 „ „	228	— 72
„ 3 „ „	258	— 42
„ 4 „ „	420	+ 120
„ 5 „ „	333	+ 33

Die stärkste Glykolyse liegt bei 2- bis 3proz. Phosphatkonzentration. Von 4proz. Phosphatkonzentration ab überwiegt die diastatische Zuckerausschüttung, die bei 3 Proz. ihr Maximum hat.

B. Versuch an der *Niere*. Eine Aufschwemmung der Niere (zerrieben) im Verhältnis von 1 : 100 mit 0,3proz. Glucose- und 3proz. Phosphatlösung (p_H 7) wird 90 Minuten bei 40° C belassen.

Reduktionswert, berechnet auf Glucose, 294 mg-Proz. Die Glykolyse (Defizit 6 mg-Proz.) ist sehr gering.

Versuch 28 (Nr. 72, Journal V).

Die Leber eines Meerschweinchens, das 24 Stunden gehungert hat, wird aufgeschwemmt mit 0,1proz. α-β-Glucoselösung mit wechselndem Phosphatgehalt (p_H 7,0). Die Aufschwemmung wird ohne Durchlüftung. 90 Minuten bei 40° C belassen.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	Defizit
Bei 1 Proz. Phosphat	68	32
„ 2 „ „	55	45
„ 3 „ „	59	41
„ 4 „ „	67	33
„ 5 „ „	77	23

Die stärkste Glykolyse liegt bei der Phosphatkonzentration von 2 bis 3 Proz.

Versuch 29 (Nr. 73, Journal V).

A. Die Leber eines Meerschweinchens, das 72 Stunden gehungert hat, wird mit 0,5proz. α-β-Glucoselösung mit wechselndem Phosphat im Verhältnis von 1 : 10 aufgeschwemmt und 90 Minuten ohne Durchlüftung bei 40° C belassen.

	Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	Bilanz
2 Proz. Phosphat	541	+ 41
3 „ „	485	— 15

Es überwiegt bei 2 Proz. Phosphat die diastatische Zuckerausschüttung, bei 3 Proz. die Glykolyse.

B. Die Niere wird aufgeschwemmt im Verhältnis von 1 : 10 mit 0,5proz. Glucose- und 1proz. Phosphatlösung. 90 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung.

Reduktionswert, berechnet auf Glucose mg-Proz.	Bilanz
518	+ 18
Keine Glykolyse.	

Versuch 30 (Nr. 83, Journal V).

	Sofort		Nach 60 Minuten		Nach 120 Minuten	
	Reduktion, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Reduktion, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Reduktion, berechnet auf Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr

A. Die *Leber* eines Meerschweinchens, das 24 Stunden gehungert hat, wird mit 0,3proz. α-β-Glucoselösung bei wechselndem Phosphatgehalt (p_H 7,0) aufgeschwemmt und bis 120 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

1 Proz. Phosphat	300	0,28°	—	0,12°	369	0,16°
3 „ „	300	0,22	—	0,16	393	0,20
5 „ „	300	0,24	—	0,12	381	0,22

B. Die *Niere* wird aufgeschwemmt im Verhältnis von 1 : 10 mit 0,3proz. α-β-Glucose- und 4proz. Phosphatlösung (p_H 7) und 120 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

4 Proz. Phosphat	300	0,16°	—	0,08°	308	0,04°

Bei der Leber ist eine Glykolyse durch diastatische Zuckerbildung verdeckt, indessen zeigt sich — wie beim Muskel — ein Drehungsabfall, der den Drehungswert der Zuckerlösung erheblich gegenüber dem Reduktionswert verringert; das gleiche Verhalten zeigt — trotz fehlender Glykolyse — die Niere. Wir dürfen deshalb sagen, daß auch die Leber und die Niere denselben Prozeß — weitgehend unabhängig von der Glykolyse — hinsichtlich der Glykometamorphose zeigen, mithin, daß die am Muskel erhobenen Gesetzmäßigkeiten auch bei der Leber und der Niere bestehen. Es sei in diesem Sinne aus unseren Versuchen ein weiterer angeführt, in dem die Verhältnisse noch deutlicher sind.

Versuch 31 (Nr. 86, Journal V).

Die Leber bzw. Niere eines Meerschweinchens, das 24 Stunden gehungert hat, wird mit 0,3proz. α-β-Glucoselösung bei wechselndem Phosphat (p_H 7) aufgeschwemmt und 120 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen. Der Reduktionswert ist auf Glucose berechnet.

	Sofort nach Zusatz		Nach 60 Minuten		Nach 120 Minuten	
	α im 2-dm-Rohr	Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Glucose mg-Proz.
			A. Leber.			
4 Proz. Phosphat	0,28°	287	0,24°	252	0,22°	333
5 „ „	0,22	330	0,16	405	0,10	400
			B. Niere.			
2 Proz. Phosphat	0,20°	250	0,08°	257	0,08°	300

Bei der Niere Abnahme und wieder Zunahme des Reduktionswertes, starke Abnahme des Drehungswertes! Beides erklärbar durch den Vorgang der Glykometamorphose.

Schließlich führen wir noch eine Reihe von Versuchen an, die über den Einfluß wechselnder p_H auf den Prozeß der Glykolyse bzw. Glykometamorphose angestellt sind.

Versuch 32 (Nr. 81, Journal V).

Die Leber bzw. Niere eines Meerschweinchens, das 72 Stunden gehungert hat, wird aufgeschwemmt mit 0,3 proz. Glucose- und 3proz. Phosphatlösung von wechselnder p_H und 90 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

p_H	$Mg_2P_2O_7$		Bilanz	Reduktionswert, als Glucose berechnet	Bilanz
	Sofort Proz.	Nach 90 Minuten Proz.	Proz.	mg-Proz.	
			A. Leber.		
4,5	2,83	2,87	+ 0,04	333	+ 33
6,3	2,85	2,63	— 0,22	354	+ 54
7,0	2,71	2,35	— 0,36	288	— 22
8,4	2,51	2,45	— 0,06	333	+ 33
			B. Niere.		
4,5	—	—	—	279	— 21

Versuch 33 (Nr. 82, Journal V).

Die Leber eines Meerschweinchens, das 24 Stunden gehungert hat, wird aufgeschwemmt mit 0,1proz. Glucose- und 3proz. Phosphatlösung wechselnder p_H und 90 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

p_H	$Mg_2P_2O_7$		Bilanz	Reduktionswert, als Glucose berechnet	Bilanz
	Sofort Proz.	Nach 90 Minuten Proz.	Proz.	mg-Proz.	
4,5	3,11	2,77	— 0,34	57	— 43
6,3	2,93	2,45	— 0,48	76	— 24
7,0	2,84	2,51	— 0,33	95	— 5
8,4	2,41	2,13	— 0,27	96	— 4

Versuch 34 (Nr. 87, Journal V).

Die Leber bzw. Niere eines Meerschweinchens, das 48 Stunden gehungert hat, wird mit 0,3proz. α-β-Glucose- und 3proz. Phosphatlösung wechselnder p_H aufgeschwemmt und 120 Minuten bei 40° C ohne Durchlüftung belassen.

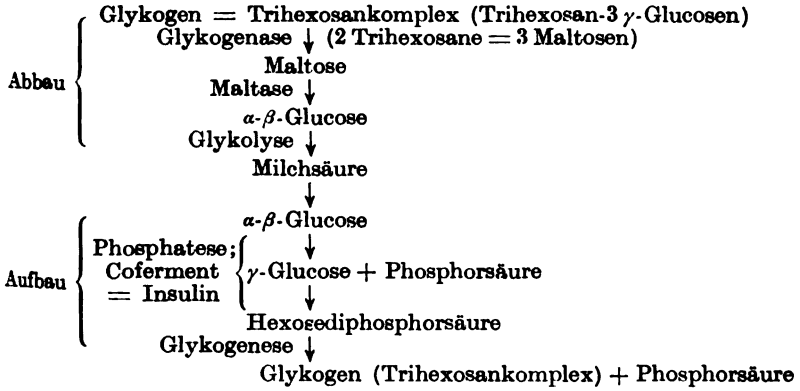
p_H	Sofort		Nach 60 Minuten			Nach 120 Minuten		
	α im 2-dm-Rohr	Red. als Glucose mg-Proz.	α im 2-dm-Rohr	Red. als Glucose mg-Proz.	Bilanz	α im 2-dm-Rohr	Red. als Glucose mg-Proz.	Bilanz
				a) Leber.				
6,3	0,24°	300	0,14°	321	+ 21	0,12°	339	+ 39
7,0	0,20	300	0,18	327	+ 27	0,18	312	+ 12
8,4	0,28	300	0,20	285	— 15	0,14	375	+ 75
				b) Niere (3,5° C 50 Minuten).				
4,7	0,20°	300	0,12°	307	+ 7	0,04°	351	+ 51

Überblickt man diese drei letzten Versuche gemeinsam, so läßt sich aus den Versuchen 33 und 34 ablesen, daß bei der p_H 7 bis 8,4 die diastatische Wirkung am größten ist, aus den Versuchen 32 und 33, daß die Glykolyse am stärksten bei saurer Reaktion ist. Infolge der Überdrehung durch die diastatische Zuckerausschüttung (Versuch 34) ist der Drehungsabfall in der Rotation der Zuckerlösung schwierig zu beurteilen; indessen scheint er bei saurer Reaktion keinesfalls kleiner zu sein als bei alkalischer.

Zusammenfassend können wir nunmehr auch für die Leber und Niere eine von der Glykolyse weitgehend unabhängige Glykometamorphose behaupten, die in der Bildung eines Zuckerphosphorsäureesters besteht, deren Aktivator bei der Leber das Insulin ist, wie unsere Versuche (VIII. Mitteilung) bereits gezeigt hatte. Wir können hypothetisch annehmen, daß dieser Hexosephosphorsäureester in der Leber identisch mit dem Hexosephosphorsäureester der Muskulatur ist, den wir Myophosphat benannt haben; zugunsten dieser Annahme spricht jedenfalls die Tatsache, daß das Insulin sowohl die Phosphatese der Muskulatur wie der Leber aktiviert. Trotz des ähnlichen Zuckerzirkels in Leber, Muskel und Niere sind Unterschiede quantitativer und auch qualitativer Art durchaus annehmbar. So müssen wir die Angreifbarkeit der α-β-Glucose durch das glykolytische Ferment in der Leber ohne weiteres zugeben, wenigstens nach unseren eigenen wie nach allen in der Literatur vorliegenden Versuchen. Der Sinn der Glykometamorphose besteht bei der Leber nur im Aufbau zum Glykogen hin. Bei der Niere dürften die Verhältnisse einigermaßen ähnliche sein. Bei der Muskulatur besteht dagegen nach den Meyerhofschen, Embdenschen u. a. Versuchen gewissermaßen eine Unangreifbarkeit der

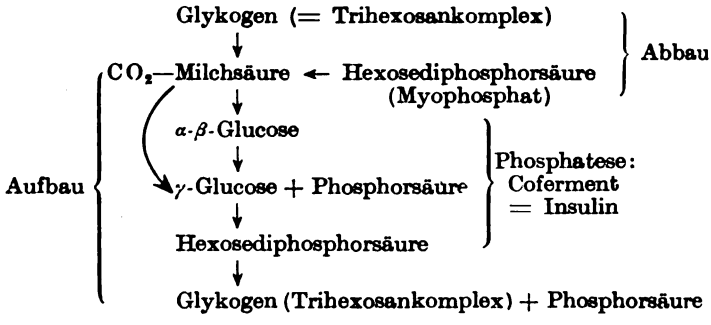
α-β-Glucose im Sinne einer Glykolyse. Hier muß die α-β-Glucose erst durch einen Umbau seitens einer Isomerase in eine angreifbare Form gebracht werden, die wir als γ-Hexose annehmen. Da diese als solche aber unbeständig ist, so nehmen wir mit Pringsheim[1]*) weiter an, daß sie in dem Phosphorsäureester des Myophosphats stabilisiert wird. Von dem Phosphorsäureester kann die γ-Hexose zu dem Trihexosankomplex (Glykogen) umgebaut werden; auf diese Weise würde es ohne weiteres erklärlich sein, daß der Muskel bei der Aktion (vgl. Meyerhof) seine Milchsäure sowohl aus dem Glykogen wie dem Lactacidogen Embdens, das wir mit dem Myophosphat gleichsetzen, produziert, während er diese Fähigkeit gegenüber der α-β-Glucose nicht besitzt. Die Anwesenheit der Phosphorsäure wie des Coferments im Muskel, das wir mit dem Insulin identifizieren, befähigt aber jederzeit den Muskel zur Bildung des Myophosphats als Zwischenstufe für Glykosenaufbau einerseits und Milchsäurebildung andererseits. Den von uns als Glykometamorphose bezeichneten Prozeß, der gewissermaßen aus zwei Akten sich vollziehen muß, nämlich den Umbau der Glucose (die eigentliche Isomerase) zur γ-Hexose und die Synthese zum Phosphorsäureester, bezeichnen wir als Myophosphatese. In dem Myophosphat, dem Hexosephosphorsäureester, begegnen wir der γ-Hexose nach Abspaltung als d-Fructose. So kommen* wir *nach dem derzeitigen Stande unserer Kenntnisse zu folgendem Schema für den Kohlehydratzirkel in der Leber und in der Muskulatur, wobei wir mit Pringsheim das Glykogen als Trihexosankomplex, d. h. das Trihexosan als Vereinigung dreier γ-Glucosen annehmen.*

I. Kohlehydratzirkel der Leber.



[1]) *H. Pringsheim*, diese Zeitschr. **156**, 109, 1925.

II. Kohlehydratzirkel der Muskulatur.



Der Aufbau von der α-β-Glucose zum Myophosphat erfolgt durchaus nicht nur oxybiotisch, sondern auch anoxybiotisch, wodurch indessen die Frage des Aufbaues der Milchsäure zum Glykogen auf Grund oxydativ gewonnener Energie in der Muskulatur nicht berührt wird.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XVII. Mitteilung:

Myophosphat.

Von

Theodor Brugsch und **Hans Horsters.**

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1926.)

In ihren Studien über die Chemie des Lactacidogens stellten *Embden* und *Laquer*[1]) zunächst fest, daß man aus frischen Muskelextrakten mit Baryt neben Phosphorsäure und neben einer bis dahin unbekannten Nucleinsäure eine Substanz ausfällen kann, die neben organisch gebundener Phosphorsäure einen Kohlehydratkomplex enthält, weiterhin zeigten sie[2]) dann, daß man aus Muskeln die Substanz rein darstellen kann, die mit der von *Lebedew* und *Young* aus Hefehexosediphosphorsäure gewonnenen Osazonverbindung vollkommen identisch war, d. h. sie ergab einen Schmelzpunkt von 148° (unkorrigiert), die elementare Zusammensetzung war identisch mit der Osazonverbindung der Hefehexosediphosphorsäure, auch stimmten sie in ihrem optischen Verhalten miteinander überein. Später haben dann *Embden* und *Margarete Zimmermann*[3]) die Frage der Chemie des Lactacidogens erneut aufgenommen; sie hielten die Identifizierung der Osazonverbindung aus dem Lactacidogen mit derjenigen aus Gärungshexosediphosphorsäure für noch nicht erwiesen, da das Osazon der letzteren mit der Abspaltung eines Phosphorsäuremoleküls einhergeht und es von vornherein denkbar war, daß das Lactacidogenmolekül die Struktur einer Hexosemonophosphorsäure habe. „Auch andere Möglichkeiten eines Unterschieds in der chemischen Beschaffenheit beider Körper ließen sich zunächst nicht ausschließen. Einer endgültigen Entscheidung konnte die Frage nur durch Isolierung der ungespaltenen

[1]) *Embden* und *Laquer*, Hoppe-Seyler **93**, 94, 1914.
[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **113**, 1, 1921.
[3]) *Embden* und *Margarete Zimmermann*, ebendaselbst **141**, 225, 1924.

Verbindung oder eines ihrer Salze entgegengeführt werden." Die Autoren arbeiteten infolgedessen eine neue biologische Methode zur Reindarstellung des Körpers aus und identifizierten die Verbindung als neutrales Brucinsalz, das sich als identisch mit dem der Gärungshexosediphosphorsäure erwies. Sie hielten hiermit den Nachweis für erbracht, daß dem Lactacidogen die Struktur einer Hexosediphosphorsäure zukommt, welche mit der bei der Hefegärung gebildeten Hexosediphosphorsäure vollkommen identisch sei. Allerdings fügen die Autoren hinzu, daß die Möglichkeit nicht ausgeschlossen sei, daß neben der Hexosediphosphorsäure in der Muskulatur auch Hexosemonophosphorsäure auftreten könne.

Das von *Embden* und *Zimmermann* angewandte Verfahren besteht kurz gesagt darin, daß nach entsprechender Vorbereitung der Tiere, die Muskulatur sofort verarbeitet wird, indem sie durch eine eisgekühlte Fleischhackmaschine getrieben wird, dann nach Verreiben mit Quarzsand in einer *Buchner*schen Presse gepreßt wird, der Preßsaft in eisgekühlten Meßzylindern aufgefangen wird und mit der gleichen Menge einer n/2 Natriumfluorid, 0,4 Glykogen und 2proz. Natriumbicarbonatlösung versetzt wird. Diese Lösung wird 4 Stunden bei 10^0 (unter der Wasserleitung) belassen, dann mit 4proz. Salzsäure und 5proz. Quecksilberchlorid nach *Schenck* gefällt und über Nacht stehengelassen. Das abgenutschte Filtrat wird durch H_2S entquecksilbert und dann nach *Clausen* durch Kupfersulfat (auf 100 ccm Filtrat 10 ccm 10proz. $CuSO_4$) + Kalkmilch im Überschuß gefällt, wobei in den Niederschlag das Lactacidogen hineingeht. Der Niederschlag wird alsdann mit H_2SO_4 in der Porzellanschale zerrieben, das ausfallende Calciumsulfat abgesaugt und mehrfach gewaschen. Die Kupfer-Kalkfällung wird wiederholt, der Niederschlag mit Schwefelsäure zersetzt, das Filtrat durch H_2S entkupfert, das Filtrat vom Schwefelwasserstoff durch Lüften befreit. Das auf $1\frac{1}{2}$ Liter mit H_2O aufgefüllte Filtrat wird alsdann mit heiß gesättigtem Barytwasser unter Vermeidung von Erwärmung versetzt, bis Kongo nur noch schwach gebläut wird und weder H_2SO_4 noch Baryt im klaren Abguß des Zentrifugats nachweisbar sind. Das Filtrat wird mit 10proz. Bleizuckerlösung völlig ausgefällt und über Nacht stehengelassen, dann der Niederschlag abgesaugt und gründlichst gewaschen. Der Bleizuckerniederschlag wird nunmehr mit wenig Wasser gut verrieben und mit H_2S versetzt und schließlich vom H_2S durch Lüften völlig befreit. Das Filtrat reduziert nach *Embden* und *Zimmermann Fehling*sche Lösung sehr stark und gibt starke Molischreaktion. Mit diesem Filtrat wurde vermittelst konzentrierter methylalkoholischer Brucinlösung das Brucinsalz dargestellt.

An der Tatsache, daß das mittels des *Embden-Laquer*schen Verfahrens bzw. mittels des *Embden-Zimmermann*schen Verfahrens nach-

gewiesene Osazon bzw. Brucinsalz Verbindungen mit einer Hexosediphosphorsäure bzw. Hexosemonophosphorsäure sind, ist wohl nicht zu zweifeln. Damit ist allerdings nicht der Beweis erbracht, daß es sich bei der Muskulatur um ein völlig mit dem Zymophosphat identisches Hexosephosphat handelt. Manche Gründe, wie z. B. das unterschiedliche Verhalten von Cozymase und Insulin (vgl. unsere XVI. Mitteilung) sprechen sogar dagegen. Zudem stehen wir ja erst am Beginn unserer Kenntnis der Hexosephosphorsäuren.

Wir haben nun, um speziell die Frage zu beantworten, ob das Myophosphat identisch mit dem Zymophosphat ist, uns an die charakteristischen optischen Eigenschaften der Zymohexosediphosphorsäure ($a_D = + 3{,}2$) und der *Robison*schen Zymohexosemonophosphorsäure ($a_D = + 25^0$) gehalten, indem wir der Meinung waren, daß dem Myophosphat im Falle der Identität eine gleiche optische Aktivität zukommen müßte. Für unsere Versuche, die wir außerordentlich umfangreich angestellt haben, waren uns naturgemäß die Erfahrungen von *Embden* und *Laquer* bzw. von *Embden* und *Zimmermann* außerordentlich wertvoll.

Aus diesen Erfahrungen sei zunächst schon folgendes erwähnt: *Embden* und *Laquer* (I. Mitteilung) fanden bei der Verarbeitung von Hundemuskulatur, Enteiweißung nach *Schenck*, Barytfällung, Zerlegung des Baryts durch H_2SO_4 starke Linksdrehung, die beim Erhitzen in Rechtsdrehung übergeht, gleichzeitig mit der Zunahme von anorganischem $-PO_4$ und mit Zunahme des Reduktionswertes der Lösung. Diese Linksdrehung beziehen die Autoren allem Anschein nach auf die Anwesenheit einer Nucleinsäure, die stark links dreht, beim Sieden mit verdünnter H_2SO_4 allmählich rechts dreht und unter Abspaltung von anorganischem $-PO_4$ ein gewisses Reduktionsvermögen aufweist.

Was nun unsere eigene Erfahrung anlangt, so haben wir uns in einem Teile der Versuche genau an die *Embden-Laquer*sche bzw. *Embden-Zimmermann*sche Methode gehalten, zum Teil haben wir die letztere aber auch modifiziert, indem wir den Glykogen + Natriumfluoridzusatz gemieden und stattdessen durch eine 0,5proz. Glucose + Insulinlösung versetzt haben, ausgehend von der Erfahrung, daß durch den Zusatz von Insulin zu der Muskelsuspension bei Anwesenheit von Glucose ein starker Drehungsabfall eintritt:

Je 10 g zerkleinerter frischer Meerschweinchenmuskel werden mit 100 ccm 0,5 α-β-Glucoselösung versetzt; zu einer Portion werden 30 Einheiten Insulin zugesetzt:

A. Ohne Insulin: Drehung sofort (2-dm-Rohr) + 0,46, nach 40 Min. + 0,44, nach 120 Min. + 0,44.

B. Mit Insulin: Drehung sofort + 0,44, nach 40 Min. + 0,36, nach 120 Min. + 0,34.

Dieser Drehungsabfall ist nach unseren Untersuchungen auf die Bildung des Myophosphats zu beziehen, so daß man biologisch sich bei der Darstellung des Myophosphats durch Zusatz von Insulin und einer Zuckerlösung (bis 0,5 Proz.) die Situation durch Verminderung des anorganischen Phosphats verbessert.

Verfolgt man nun bei den einzelnen Phasen des Vorgehens die optische Aktivität der zerlegten Filtrate, so erhält man, wie *Embden* und *Laquer* es angegeben haben, nach der Barytfällung und vorsichtiger Zerlegung durch H_2SO_4 deutlich linksdrehende Lösungen, die auch stark reduzieren, Molischreaktion ergaben, und eine bald schwächere oder stärkere Orcinreaktion. Man erhält aber auch nach der Kalkfällung eine Lösung mit deutlicher Linksdrehung, sofern man bei der Zerlegung von einem Überschuß der H_2SO_4 sich frei hält und die Manipulation des Zerlegens mit großer Vorsicht ausübt. Eine stärkere mineralsaure Reaktion der Filtrate vermag bereits einen Umschlag der Drehung hervorzurufen, d. h. eine Spaltung herbeizuführen, das gleiche bewirkt auch ein starker Überschuß am Alkali. Es ist uns nun an einer ganzen Reihe von Fällen gelungen, die Linksdrehung der Lösung nach Baryt- bzw. Kalk- und Bleifällung und deren Zerlegung zu erhalten, wobei wir schließlich zu Lösungen kamen mit erhaltenem Reduktionsvermögen, starker Molischreaktion und Abspaltbarkeit von Phosphorsäure nach Aufschließen mit NH_3 am Rückflußkühler. Dabei ergab sich:

1. bei der Verarbeitung von frischem Hundemuskel nach der Bleifällung eine Drehung von $\alpha = -0{,}2^0$ (1-dm-Rohr). Bei der Spaltung mit 40 Proz. NH_3 2½ Stunden am Rückflußkühler ergaben 10 ccm 0,0253 mg $-PO_4$; danach läßt sich — berechnet auf die Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$ — eine spezifische Drehung von etwa -30^0 berechnen. Der Körper ist bei vorsichtiger Neutralisierung alkoholfällbar.

2. bei der Verarbeitung von frischem Meerschweinchenmuskel nach der Zerlegung der Bleifällung eine Drehung von $-0{,}11^0$ (1-dm-Rohr). Nach der Spaltung mit 40 Proz. NH_3 2 Stunden am Rückflußkühler ergaben 10 ccm = 0,0095 mg PO_4; berechnet auf die Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$, gibt dieser Wert eine spezifische Drehung von etwa -40^0.

3. bei der Verarbeitung von frischem Hundemuskel nach der Zerlegung der Bleifällung eine Drehung von $-0{,}06^0$ (1-dm-Rohr). In 10 ccm beträgt der PO_4-Gehalt 0,0056 mg; auf die Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$ berechnet, ergibt dieser Wert eine spezifische Drehung von etwa -40^0.

Wir haben in einigen Versuchen auch den Körper alkoholisch (bei vorsichtiger Neutralisierung) gefällt und seine Drehung bestimmt; es ergab sich als Na-Salz eine spezifische Drehung von -20^0 bzw. -27^0. Keinesfalls haben wir es aber wegen der Divergenz der optischen Befunde mit einem mit dem Zymophosphat identischen Körper zu tun.

Dem Einwand, daß wir es in diesen angeführten Fällen etwa mit dem Vorhandensein einer Nucleinsäure zu tun gehabt haben, können

wir einmal mit dem Hinweis auf das Fehlen (oder höchstens minimalem Vorhandensein) einer Orcinreaktion begegnen, sodann mit dem Hinweis, daß die Stickstoffreaktion in einigen Fällen völlig negativ war. Es ist uns aber auch nicht gelungen, mit dem in Lösung befindlichen Körper trotz stärkerer Konzentration zu einer Phenylhydrazinverbindung mit charakteristischem Schmelzpunkt zu kommen! Daß der stark linksdrehende Körper durch Mineralsäuren in einen rechtsdrehenden gespalten wird, haben, wie schon erwähnt, bereits *Embden* und *Laquer* gezeigt, auch wenn sie anscheinend diese Drehungsänderung auf das Konto der Nucleinsäure, deren Existenz etwa keineswegs von uns bestritten wird, gesetzt haben. Man wird der Deutung der Verhältnisse wohl am ehesten gerecht, wenn man die stark linksdrehende Zucker-Phosphorsäureverbindung als eine Hexosediphosphorsäure anspricht, die nicht identisch mit der Zymophosphorsäure, dem Zymophosphat, ist, sondern am besten als Myophosphat bezeichnet wird oder Myohexosediphosphorsäure, während der durch Säure oder Alkali abgespaltene Ester eine Monohexosephosphorsäure ist, deren Identität mit der Zymohexosemonophosphorsäure von *Robison* erst festgestellt werden müßte.

Für quantitative Schätzungen des Myophosphats möchten wir aber schon jetzt auf Grund unserer Versuche folgendes Verfahren empfehlen: Die Aufschwemmung frischer zerkleinerter Muskulatur in 0,1- bis 0,5proz. Glucoselösung wird, nachdem sie klar durch Mull geseiht ist, mit der zehnfachen Menge Äthylalkohols versetzt und 24 Stunden stehengelassen. Der Niederschlag wird mit Alkohol dreimal gewaschen und in Wasser gelöst. Der in Wasser gelöste Rückstand wird mit 10proz. Bleiessiglösung gefällt (ohne Überschuß!) und dann vorsichtig mit H_2SO_4 zerlegt; die Prozedur kann wiederholt werden. Zur quantitativen schätzungsweisen Auswertung kann die Linksdrehung ($\alpha_D = -40$) des Filtrats zugrunde gelegt werden.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XVIII. Mitteilung:

Die Spaltung der Zymohexosediphosphorsäure durch die Muskulatur und ihr Spaltprodukt die Monohexosephosphorsäure.

Von

Theodor Brugsch, Melanie Cahen und Hans Horsters.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In unserer XI. Mitteilung haben wir den Nachweis erbracht, daß Hexosediphosphorsäure, die bei der Gärung entsteht, durch Leber und Muskel in eine Monohexosephosphorsäure bzw. in d-Fructose und Phosphorsäure gespalten wird. Die Fähigkeit zur Spaltung (Phosphatase) besitzt nicht nur der frische Muskel, sondern auch der durch Alkohol gehärtete Muskel. Die bei dieser Spaltung entstehende Monophosphorsäure hielten wir nach einer einmaligen Analyse auf ihren Drehungswert und unter Zugrundelegung ihres Phosphorsäuregehalts nicht für identisch mit der von *Neuberg* durch Säurehydrolyse aus dem Diphosphat erhaltenen Hexosemonophosphorsäure und mit der von *Robison* bei der Hefegärung festgestellten Hexosemonophosphorsäure. Wir haben nun diese Frage weiter verfolgt und uns eingehend mit der Natur dieses Körpers beschäftigt. Zu diesem Behufe wurden wieder Spaltungsversuche mit Trockenmuskel vom Hunde bzw. Kaninchen und Meerschweinchen angestellt, wie sie schon in der XI. Mitteilung durchgeführt worden waren.

Versuch 19 (Journal V).

3 g hexosediphosphorsaures Ca und 20 g Trockenmuskel vom Kaninchen werden in 300 ccm H_2O bei 40° C unter Toluolzusatz belassen.

Drehungswinkel	sofort			im 1-dm-Rohr	. . . . .		+ 0,02°
,,	nach	30	Minuten	im 1-dm-Rohr	. . .		+ 0,10
,,	,,	60	,,	,, 1- ,,	. . .		+ 0,14
,,	,,	90	,,	,, 1- ,,	. . .		+ 0,15
,,	,,	120	,,	,, 1- ,,	. . .		+ 0,16

Nach 2 Stunden wird die Aufschwemmung abfiltriert, die Lösung auf 70° erhitzt, der gebildete Niederschlag abfiltriert, dann die Prozedur dreimal wiederholt, schließlich die Lösung auf 15° C abgekühlt, CO_2 eingeleitet, wiederum klar filtriert in 1 Liter Methylalkohol; der Niederschlag nach 24stündigem Stehen abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Der getrocknete Niederschlag dreht in 1proz. Lösung $= + 0{,}20$ (1-dm-Rohr) $a_D = + 20°$. Die Phosphorsäurebestimmung ergibt in 5 ccm der 1proz. Lösung = 16 mg, was der Formel $C_6H_{11}O_5PO_4Ca$ entspricht. Schmelzpunkt der Phenylhydrazinverbindung des Osazons = 151° (die Kristalle bräunen sich bei 136°, sintern bei 140° und schmelzen bei 151°). Durch Umkristallisieren aus Alkohol und Wasser wird ein Osazon erhalten, das bei 136° C schmilzt.

Bei einem zweiten analogen Versuch gelang es uns, sofort ein Osazon zu gewinnen, das bei 135 bis 136° C schmolz.

Versuch 10 (Journal V).

3g hexosediphosphorsaures Na, ferner 30g Trockenmuskel vom Hunde, werden mit 300 ccm H_2O versetzt und bei 40° C unter Toluolzusatz belassen.

Drehung nach	30	Minuten	im	1-dm-Rohr	. . . . .	— 0,02°
,, ,,	60	,,	,,	1- ,,	. . . . .	+ 0,06
,, ,,	90	,,	,,	1- ,,	. . . . .	+ 0,03

Nunmehr wird filtriert und das Filtrat mit Bariumhydroxyd gefällt, sofort CO_2 eingeleitet, wieder filtriert, dann auf 70° erhitzt und das heiße Filtrat zu der achtfachen Menge Alkohol einlaufen gelassen, der Niederschlag wird nach 24 Stunden abfiltriert, getrocknet, in Wasser aufgenommen und mehrmals auf 70° C erhitzt, filtriert, in 1 Liter Alkohol einlaufen gelassen, nach 24 Stunden filtriert, im Vakuum getrocknet.

0,08g in 10 ccm H_2O gelöst, ergeben eine Drehung von + 0,14, $a_D = 17°$.

PO_4-Gehalt in einer 0,416proz. Lösung = 0,101 Proz., was auf die Formel $C_6H_{11}O_5PO_4Ba$ stimmt.

Aus anderen Versuchen gleicher Art dargestelltes monohexosephosphorsaures Ba haben wir nach Lösung in Wasser durch H_2SO_4 zersetzt und die Drehung der reinen Säure bestimmt; sie ergab einen Wert von $a_D = 23$ bis 25°. *Danach hegen wir nicht den geringsten Zweifel, daß wir es hier mit einer stark rechtsdrehenden Monohexosephosphorsäure zu tun haben, die identisch ist mit der Hexosemonophosphorsäure Robisons aus der Hefe.* Der Drehungswinkel von 8,3°, den wir in unserer XI. Mitteilung gefunden haben, bezieht sich, wie die weitere Analyse des Körpers zeigte, nicht auf die reine Hexosemonophosphorsäure bzw. deren Salze, sondern er entsprach einem Gemisch beider. Wir können nun ganz allgemein aus unseren Versuchen, die wir in großer Reihe angestellt haben,

schließen, daß sowohl beim Trockenmuskel wie beim frischen Muskel, desgleichen bei der Trockenleber wie frischer Leber der Abbau der Hexosediphosphorsäure oder des Zymophosphats über die Hexosemonophosphorsäure läuft. Die Trennung der Hexosediphosphorsäure von der Hexosemonophosphorsäure ist dadurch ermöglicht, daß die hexosediphosphorsauren Ba- bzw. Ca-Salze bei einer Temperatur von 70° aufwärts schwer wasserlöslich sind, die Salze dagegen der Monohexosephosphorsäure leichter löslich. Die Trennungsversuche durch Erhitzen und Abfiltrieren müssen dabei so lange wiederholt werden, bis die Hexosemonophosphorsäure rein zurückbleibt.

Es war nunmehr die Frage zu erörtern, wie der Abbau der Monohexosephosphorsäure erfolgt. Aus dem Ergebnis der Versuche unserer XI. Mitteilung hatten wir die Annahme gemacht, daß der Trockenmuskel die Hexosemonophosphorsäure nicht weiter zu spalten vermag; nachdem uns aber die Reindarstellung der Hexosemonophosphorsäure gelungen war, konnten wir Versuche mit Trockenmuskel und Hexosemonophosphorsäure anstellen.

Versuch 14 (Journal V).

15 ccm einer 0,25proz. hexosemonophosphorsauren Ba-Lösung werden mit 1 g Trockenmuskel (Hund) bei 40° C belassen.

Drehung im 2-dm-Rohr	sofort	+ 0,09
„ „ 2- „	nach 20 Minuten	— 0,06
„ „ 2- „	„ 40 „	— 0,08

Es läßt sich in der Lösung Fruchtzucker nachweisen; *Seliwanoff*sche Reaktion stark.

Versuch 130 (Journal IV).

18 ccm einer etwa 0,3proz. hexosemonophosphorsauren Mg-Lösung mit 1 g Trockenmuskel vom Hunde bei 40° C.

Drehung im 2-dm-Rohr	sofort	+ 0,14
„ „ 2- „	nach 1 Stunde	— 0,2

Es läßt sich in der Lösung Fruchtzucker nachweisen; *Seliwanoff*sche Probe sehr stark.

Es ist schon nach diesen beiden Versuchen keine Frage mehr, daß auch die Trockenmuskulatur eine Phosphatase besitzt, die die Monophosphorsäure in d-Fructose und Phosphorsäure aufspaltet. In diesem Sinne sind die beiden nunmehr folgenden Versuche beweisend, die uns zeigen, wie die Trockenmuskulatur eine sehr wirksame Phosphatase besitzt, die stufenweise die Hexosediphosphorsäure in Hexosemonophosphorsäure spaltet und diese wiederum in d-Fructose und Phosphorsäure.

Versuch 166 (Journal IV).

2 g hexosediphosphorsaures Na, gelöst in 200 ccm Wasser + 10 g Trockenmuskel (Kaninchen), bei 40° (Toluolzusatz).

α (2-dm-Rohr)	= + 0,08
α nach 2 Stunden	= + 0,1
α „ 3 „	= + 0,1
α „ 4 „	= + 0,08
α „ 24 „	= — 0,32

In der Lösung konnte neben d-Fructose Hexosemonophosphorsäure und Hexosediphosphorsäure nachgewiesen werden.

Versuch 155 (Journal IV).

2 g hexosediphosphorsaures Na, 200 ccm, 15 g Trockenmuskel (Hund) bei 40°.

Drehung sofort im 2-dm-Rohr	= + 0,07 bis 0,08
„ nach 2 Stunden im 2-dm-Rohr .	= — 0,28
„ „ 3 „ „ 2- „ .	= — 0,36

Auch hier war der Nachweis von Hexosediphosphorsäure, Hexosemonophosphorsäure und d-Fructose möglich.

Auf Grund unserer letzten Ergebnisse dürfen wir nunmehr den Abbau der Zymohexosediphosphorsäure durch die Muskulatur folgendermaßen festlegen:

Zymo-Hexosediphosphorsäure
|
Phosphatase—Zymo-Hexosemonophosphorsäure und — PO_4
|
d-Fructose und — PO_4

Da, wie wir gezeigt haben, das Zymophosphat nicht mit dem Myophosphat identisch ist, so ist für den Kohlehydratstoffwechsel des tierischen Organismus das Zymophosphat sowohl für Leber wie Muskulatur nur nach dem Gesichtspunkt der d-Fructose und Phosphorsäure zu bewerten, weil sowohl Leber wie Muskeln durch ihre Phosphatasen eine schnelle Aufspaltung in diese vornehmen. Wir führen hier noch einen Versuch an, der zeigt, daß in der Tat der frische Muskel keine gesteigerte Milchsäurespaltung aus dem Zymophosphat vornimmt.

Versuch 160 (Journal IV).

I. 100 ccm 0,5 proz. α-β-Glucose + 2 proz. Phosphatlösung p_H 7 + 10 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel bei 40° C. Milchsäure nach 2 Stunden 51,8 mg-Proz.

II. 100 ccm H_2O + 10 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel bei 40° C. Milchsäure nach 2 Stunden 45,0 mg-Proz.

III. 100 ccm 1proz. Zymophosphatlösung + 10 g frischer, zerkleinerter Meerschweinchenmuskel bei 40° C. Milchsäure nach 2 Stunden 43,0 mg-Proz.

Wir haben uns schließlich noch der Frage des p_H-Optimums der Phosphatasewirkung zugewandt, einer Frage, der bereits *Demuth* nachgegangen ist. Nach *Demuth*[1]) liegt das H-Optimum für die Phosphatase bei $p_H = 7{,}4$.

Wir haben die Optima bei der Zerlegung des Zymomonophosphats und des Zymodiphosphats unter Phosphatpufferung durch Feststellung des Drehungswertes ermittelt mit folgendem Ergebnis.

Versuch 17 (Journal V).

0,76proz. Lösung von Ca-Hexosemonophosphat (α im 2-dm-Rohr = + 0,24) + 3 Proz. Phosphat wechselnder p_H + Trockenmuskel vom Hunde bei 40° C.

10 ccm + 0,5 g Trockenmuskel bei 40° C.

p_H 8,4	nach	1	Stunde	α (2-dm-Rohr)	=	— 0,08
p_H 7,0	„	1	„	α (2- „)	=	+ 0,06
p_H 6,3	„	1	„	α (2- „)	=	+ 0,12
p_H 4,7	„	1	„	α (2- „)	=	+ 0,14

Die stärkste Spaltung liegt bei der Zymophosphatase bei p_H 8,4, also im *alkalischen* Medium.

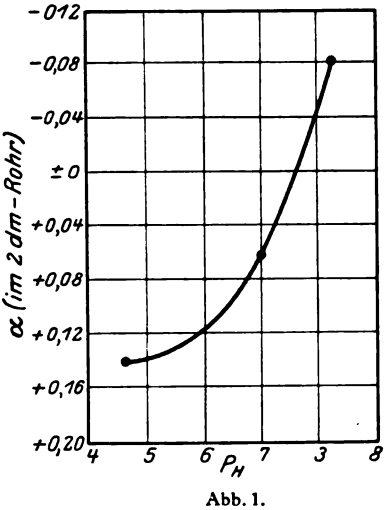


Abb. 1.

[1]) *Fritz Demuth*, diese Zeitschr. **159**, 415, 1925.

Versuch 20 (Journal V).

1proz. Lösung von zymohexosediphosphorsaurem Ca (α im 2-dm-Rohr = + 0,04) + 3 Proz. Phosphat wechselnder p_H + Trockenmuskel vom Meerschwein.

10 ccm + 0,5 g Trockenmuskel bei 40° C.

p_H 8,4	nach ¾	Stunden	α (2-dm-Rohr)	= — 0,18
p_H 7,0	„ ¾	„	α (2- „)	= — 0,06
p_H 6,3	„ ¾	„	α (2- „)	= — 0,04
p_H 4,7	„ ¾	„	α (2- „)	= — 0,02

Es zeigt sich auch für die Zymodiphosphatase das Maximum der Spaltung im alkalischen Medium (siehe auch Abbildung).

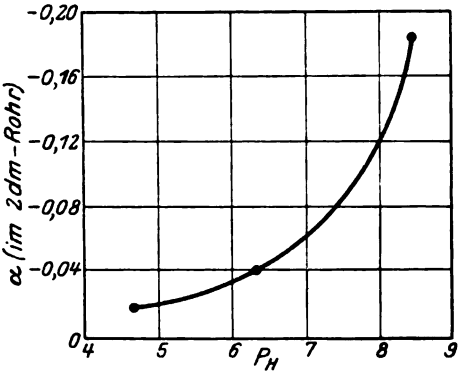


Abb. 2.

Versuch 26 (Journal V).

1proz. zymohexosediphosphorsaure Na-Lösung mit 3 Proz. Phosphat wechselnder p_H. Zusatz von Trockenmuskel vom Hunde (α der Zymophosphatlösung im 2-dm-Rohr = + 0,07 bis 0,08).

10 ccm + 0,5 g Trockenmuskel bei 40° C.

p_H 8,4	nach ¾	Stunden	α (2-dm-Rohr)	= — 0,16
p_H 7	„ ¾	„	α (2- „)	= — 0,08
p_H 6,3	„ ¾	„	α (2- „)	= — 0,02
p_H 4,7	„ ¾	„	α (2- „)	= + 0,04

Es zeigt sich das Maximum der Phosphatasewirkung ebenfalls im alkalischen Medium.

Wir dürfen aus der Koinzidenz der Optima für die Zymomonophosphatase und die Zymodiphosphatase den Schluß auf Identität beider Phosphatasen ziehen.

Zusammenfassung.

Die Hexosediphosphorsäure (= d-Fructosediphosphorsäure) der Hefegärung, auch Zymophosphat oder Zymodiphosphat im engeren Sinne benannt, wird durch eine Phosphatase der Leber und Muskulatur

des Warmblüters zunächst in Hexosemonophosphorsäure (= Zymomonophosphat) und Phosphorsäure und dann in d-Fructose und Phosphorsäure gespalten.

Die Hexosemonophosphorsäure ist identisch mit der von *Robison* bei der Hefegärung gefundenen ($\alpha_D = 25^0$). Die Optima der Phosphatasewirkung der Zymodiphosphatase und Zymomonophosphatase werden als identisch erklärt.

Da Zymophosphat nicht als identisch mit Myophosphat angenommen wird (vgl. XVI. und XVII. Mitteilung), ist es verständlich, daß das Zymophosphat im tierischen Warmblüterorganismus nur dem Abbau unterliegt.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XIX. Mitteilung:

Zum Mechanismus der Insulinwirkung.

Von

Theodor Brugsch und **Hans Horsters.**

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1926.)

Sowohl wir[1]) als *Virtanen*[2]) haben etwa gleichzeitig die Insulinwirkung als Aktivierung einer Phosphatese auf Grund experimenteller Feststellung behauptet. Nun sieht *Virtanen* in unserem Satze, den wir in einer späteren Mitteilung schrieben: „*Virtanen* kommt daher seinerseits zu dem gleichen Schluß, den wir mit Evidenz aus unserer achten Mitteilung gezogen hatten, daß das Insulin den Zuckerabbau im Organismus fördert, indem es die Zymophosphatbildung aktiviert", einen Grund zum Widerspruch[3]), da nach seiner Meinung die Zymophosphatbildung als Vorstufe der Milchsäurebildung diene, also der Vorgang folgendermaßen verlaufe: Hexose—Zymodiphosphat—Milchsäure—Glykogen, während nach unserer Meinung der Prozeß verlaufe: Hexose—Milchsäure—Zymodiphosphat—Glykogen. Dazu haben wir folgendes zu bemerken. Es kommt bei der Beurteilung des Insulins und damit für die Beurteilung des Diabetes mellitus auf das *Wesentliche* an: Das Wesentliche liegt darin, daß in der Tat die Zuckerverwertung durch die Aktivierung der Phosphatese bewirkt wird und damit die Glykogensynthese. Die Frage des „Wie" ist zurzeit eine hypothetische. *Wie* aus dem rechtsdrehenden Zucker der linksdrehende Hexosephosphatzucker entsteht, hatten wir in unserer erst erschienenen Mitteilung (März 1925, Klin. Wochenschr. 4, Nr. 4) mit folgenden Worten aus-

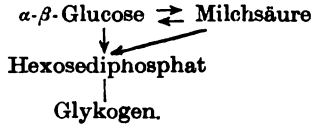
---

[1]) *Brugsch* und *Horsters*, diese Zeitschr. 155, 459, 1925 (eingegangen bei der Redaktion am 9. Januar 1925); ferner „Das Insulinproblem", Klin. Wochenschr. 4, Nr. 10, 1925 (erschienen März 1925).

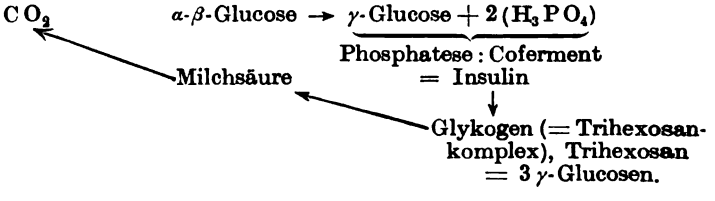
[2]) *Virtanen*, Ber. 58, Heft 4, S. 135 (eingegangen bei der Redaktion am 17. Februar 1925).

[3]) *Derselbe*, diese Zeitschr. 171, 76, 1926.

gedrückt. „Der Sinn der Phosphorylierung zur d-Fructosediphosphorsäure ist der, daß aus einem rechtsdrehenden Zucker, der Glucose, durch Aufspaltung in Milchsäure und Bindung an die Phosphorsäure ein linksdrehender, d. h. sterisch veränderter Zucker wird, der für den Organismus erst verwertbar wird." Das ist eine Vorstellung, die immerhin möglich war, auch wenn sie durch unsere neueren Ergebnisse nicht mehr nötig wird. Die Vorstellung *Virtanens* aber, daß die Milchsäurebildung von der Bildung des Zuckerphosphats abhängt, ist in dieser allgemeinen Fassung für den Warmblüterorganismus sicher nicht richtig. Es läßt sich am pankreasdiabetischen Hunde und Menschen, die man doch insulinarm nennen muß, ganz leicht zeigen, daß die Störung nicht an der Milchsäurebildung liegt, die nach dem *Virtanen*schen Schema unbedingt gefolgert werden müßte, weil intravenös injizierte Milchsäure (10 bis 20 g!) quantitativ ohne jeden Verlust als α-β-Glucose ausgeschieden wird[1]). Der Körper (und unserer Meinung ist es hier die Leber) vermag, genau umgekehrt wie aus der Glucose (in der Leber) die Milchsäurebildung geschieht, diese quantitativ ohne Verlust wieder in α-β-Glucose überzuführen. Das allein würde für die Leber schon zu der Aufstellung des Schemas berechtigen.



Aber ganz abgesehen von den Einwänden *Virtanens* haben wir selbst bereits auf Grund unserer neueren Ergebnisse (s. dieses Heft) schon *vor* der letzten Mitteilung *Virtanens* in dieser Zeitschrift[2]) unsere jetzige Auffassung von der Glykogensynthese folgendermaßen schematisiert[3]):



Auch dieses Schema ist ein allgemeines grobes, doch auch nur vorläufiges, wobei die einzelnen Organe des Warmblüterorganismus

---

[1]) Die Arbeit erscheint in einer unserer nächsten Mitteilungen.

[2]) Eingegangen bei der Redaktion am 15. Februar 1926.

[3]) *Brugsch* und *Horsters*, Glykolyse, Insulin, Coferment. Med. Klin., Jahrg. 1926, Nr. 3 (erschienen Januar, vorgetragen am 16. Dezember 1925 in der Berl. med. Ges.).

recht verschieden sich im Kohlehydratstoffwechsel verhalten: So vermag die Leber ohne weiteres α-β-Glucose in Milchsäure zu verwandeln, der Muskel bewirkt die Milchsäurebildung anscheinend nur aus γ-Hexosen. Den Umbau der α-β-Glucose in eine γ-Glucose, die nicht stabil ist, kann man sich durch eine Isomerase vorstellen, die den ersten Akt der Veresterung einleitet. Das Wesentliche erscheint uns aber gegenüber *Virtanen* die Tatsache zu sein, daß *wir* zuerst die Aktivierung der Phosphatese durch Insulin aus unseren experimentellen Arbeiten erschlossen haben, daß wir weiter für die Nichtidentität des Zymophosphats mit dem Myophosphat eingetreten sind und daß wir die Insulinwirkung nicht aus einer Oxydationssteigerung der Glucoseverbrennung noch aus einer verringerten Glykolyse erklären. Die Insulinwirkung liegt in ihrem Schwerpunkt in der Veränderung der Glucose zum Hexosephosphat (und damit zum Glykogen hin), und in diesem Punkte decken sich doch wohl unsere Auffassungen mit denen von *Virtanen*. Daß sich die biochemischen Vorstellungen der Gärchemie nicht völlig auf die Physiologie des Warmblüters übertragen lassen und umgekehrt, ist doch ohne weiteres begreifbar.

Studien über intermediären Kohlehydratumsatz.

XX. Mitteilung:

Der Wasserstoffexponent p_H des Vollblutes nach Insulininjektion beim Kaninchen.

Von

Theodor Brugsch und **Hans Horsters.**

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juni 1926.)

Im Beginn unserer Studien über intermediären Kohlehydratumsatz und Insulin[1]) hatte uns die Ähnlichkeit zwischen hypoglykämischen Zuständen und den Erscheinungen bei Säurevergiftungen dazu geführt, die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Serums und des Vollblutes beim Ablauf der Insulinreaktion einer Prüfung zu unterziehen. Die Messungen wurden damals zusammen mit *A. Benatt* im Serum bei durchströmendem Wasserstoff und im Vollblut mit der stehenden Gasblase in der U-Elektrode vorgenommen. Die erhaltenen Zahlen hatten wir durch die Bestimmung der Titrationsacidität bzw. der Alkalireserve nach *Rohonyi*[2]) ergänzt. Dabei waren wir uns bewußt, daß, obwohl Titrationsmethoden als solche für eine auch nur näherungsweise gültige Bestimmung von Wasserstoffzahlen nicht angängig sind, derartige Messungen für die Bestimmung des Vorrats an Puffersubstanzen im Serum immerhin eine Übersicht gestatten. Die *aktuelle Acidität im Vollblut* hatten wir in *einer* Versuchsreihe mittels der Methode der stehenden Gasblase in der U-Elektrode gemessen. Im Verlauf unserer Untersuchungen trat aber immer mehr das Bedürfnis zutage, mit Hilfe der letzteren Methodik, die im Hinblick auf unsere Versuchsrichtung sich als die Methode der Wahl herausstellte, über die Änderung der aktuellen Acidität des Vollblutes nach Insulininjektion ein einheitliches Bild zu gewinnen. Denn trotz einer Reihe von Arbeiten, die auf diesem Gebiet ausgeführt wurden, ist die Bedeutung der Insulinwirkung für die aktuelle Acidität des Blutes nach wie vor strittig.

---

[1]) Diese Zeitschr. **147**, 117, 1924.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 51

Collip[1]), *Major*[2]), *Wohlgemuth* und *Koga*[3]), *Davies*[4]), *Killian*[5]) gelangten zu teilweise entgegengesetzten Ansichten. *Page*[6]) versucht, vielleicht nicht mit Unrecht, die verschieden gearteten Befunde auf die Art der Ernährung der Versuchstiere zurückzuführen. In letzter Zeit haben *Wernicke, Savino, Deulofeu* und *Scotti*[7]) sich mit der Insulinwirkung auf Alkalireserve und p_H beim Pferde eingehend befaßt. Sie finden eine sehr schwache Verminderung der elektrometrisch gemessenen Wasserstoffionenkonzentration, sowie eine gleichfalls geringe Abnahme der Alkalireserve mit der *van Slyke*schen Methodik.

In unseren vorliegenden Versuchen haben wir uns auf eine möglichst sorgfältige Untersuchung der aktuellen Acidität des Vollblutes beim Kaninchen beschränkt. Die Tiere erhielten einige Zeit vor Versuchsbeginn eine vorwiegend basische Diät, bestehend aus Heu und Mohrrüben mit wenig Hafer. Von den nahezu gleich schweren Tieren wurde ein Teil vor Beginn der eigentlichen Versuche meist 24 Stunden ohne Nahrung gelassen. Das für die Messungen bestimmte Blut entnahmen wir in einigen Fällen aus der freigelegten Vena jugularis, in anderen Fällen aus der Ohrvene mittels einer paraffinierten Rekordspritze, und zwar unter Vermeidung jeglicher Berührung mit der atmosphärischen Luft. Bei einiger Übung gelingt es leicht, auch aus den Randvenen des Kaninchenohres das Blut ohne Entbindung von CO_2 zu entnehmen. In allen Fällen wurde die Gerinnung durch Zusatz von reinstem Natriumoxalat verhindert. Die weitere Aufbewahrung des Blutes erfolgte unter gereinigtem Paraffin, das nach unseren Voruntersuchungen säurefrei war. Aus einer größeren Reihe von Versuchen führen wir folgende an.

A. Versuche an Hungertieren.

Versuch 3 vom 18. Februar 1926.

Kaninchen 92, Gewicht 1,8 kg. 24-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Vena jugularis. Das Tier war während der Versuchsdauer aufgebunden und stark erregt. Zimmertemperatur 22°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 22°	p_H korr.
Vorher	0,151—0,150	7,46	7,26 ± 0,05
9h15′	20 E. Insulin „*Welcome*“		
10 15	0,101—0,102	7,46	7,26 ± 0,05
11 10	0,079	7,38	7,18 ± 0,05
11 40	0,172	7,21	7,01 ± 0,05
12 10	0,178	7,38	7,18 ± 0,05

Keine hypoglykämischen Erscheinungen.

[1]) Journ. of biol. Chem. **55**, 38, 1923.
[2]) Journ. Amer. med. Ass. **1**, 337, 1923.
[3]) Klin. Wochenschr. **1**, 386, 1923.
[4]) Brit. med. Journ. **1**, 847, 1923.
[5]) Proc. Soc. exper. Biol. and Med. **21**, 22, 1923.
[6]) Amer. Journ. Physiol. **66**, 1, 1923.
[7]) C. r. soc. biol. **92**, 896, 1925.

Versuch 6 vom 11. März 1926.

Kaninchen 87, Gewicht 2,0 kg. 40-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Ohrvene. Das Tier läuft während des Versuchs frei umher. Zimmertemperatur 18°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 18°	p_H korr.
Vorher	0,070—0,069	7,48	7,28 ± 0,05
9h20'	20 E. Insulin „*Schering*"		
10 20	0,069—0,065	—	—
11 45	0,035—0,032	—	—
12 10	0,060—0,056*)	7,22—7,20	7,01 ± 0,05

*) Hypoglykämische Krämpfe.

Versuch 7 vom 19. März 1926.

Kaninchen 88, Gewicht 3 kg. 24-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Ohrvene. Tier läuft frei umher. Zimmertemperatur 18°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 18°	p_H korr.
Vorher	0,092—0,096	7,48—7,48	7,28 ± 0,05
9h20'	20 E. Insulin „*Schering*"		
10 20	0,065—0,063	—	—
11 20	0,037—0,038*)	7,28—7,27	7,07 ± 0,05

*) Starke Krämpfe.

Versuch 8 vom 23. März 1926.

Kaninchen 76, Gewicht 2,6 kg. 17-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Ohrvene. Tier läuft frei umher während des Versuchs. Zimmertemperatur 17°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 17°	p_H korr.
Vorher	0,128—0,131	7,44—7,45	7,24 ± 0,05
9h25'	10 E. Insulin „*Schering*"		
10 15	0,024	—	—
10 45	0,037—0,030*)	7,47—7,46	7,26 ± 0,05

*) Beginnende Krämpfe.

Versuch 9 vom 27. März 1926.

Kaninchen 85, Gewicht 2,3 kg. 20-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Ohrvene. Tier läuft frei umher. Zimmertemperatur 20°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 20°	p_H korr.
Vorher	0,091—0,098	7,49—7,47	7,28 ± 0,05
9h20'	5 E. Insulin „*Schering*"		
10 00	0,057—0,060	—	—
10 30	0,060—0,059*)	7,56	7,36 ± 0,05
11 30	0,093—0,089	7,49—7,51	7,30 ± 0,05

*) Kein hypoglykämischer Komplex.

Versuch 10 vom 31. März 1926.

Kaninchen 74, Gewicht 1,95 kg. 24-Stunden-Hungertier. Blutentnahme aus der Ohrvene. Tier läuft frei umher. Zimmertemperatur 20°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 20°	p_H korr.
Vorher	0,096—0,097	7,44—7,47	7,24 ± 0,05
9h00′	5 E. Insulin „*Schering*“		
9 30	0,031—0,034	—	—
10 15	0,027—0,027 *)	6,92—6,85	6,69 ± 0,05

*) Das Tier hat einen starken hypoglykämischen Komplex.

B. Versuche an normal genährten Tieren.

Versuch 4 vom 8. März 1926.

Kaninchen 83, Gewicht 1,90 kg, normal genährt ohne Hunger. Blutentnahme aus der Vena jugularis. Das Tier war während des Versuchs aufgebunden. Zimmertemperatur 19°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 19°	p_H korr.
Vorher	0,160—0,161	7,48—7,50	7,29 ± 0,05
9h35′	25 E. Insulin „*Schering*“		
10 30	0,145—0,141	—	—
11 15	0,080—0,076	—	—
12 25	0,109—0,115	7,44—7,47	7,25 ± 0,05

Kein Komplex während des Versuchs.

Versuch 5 vom 11. März 1926.

Kaninchen 109, Gewicht 2,1 kg, normal genährt, kein Hunger. Blutentnahme aus der Vena jugularis. Das Tier war während des Versuchs aufgebunden. Zimmertemperatur 19°.

	Blutzuckerwerte	p_H bei 19°	p_H korr.
Vorher	0,190—0,198	7,44—7,47	7,25 ± 0,05
10h30′	20 E. Insulin „*Schering*“		
11 30	0,134—0,123	7,52—7,51	7,32 ± 0,05
	20 E. Insulin „*Schering*“		
12 15	0,101—0,095	—	—
1 20	0,144—0,138	7,47—7,47	7,27 ± 0,05

Keine hypoglykämischen Erscheinungen.

Unsere Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß man bei der Beurteilung von p_H-Verschiebungen im Vollblut unter Einwirkung von Insulin zunächst zwischen gut gefütterten und zwischen Hungertieren zu unterscheiden hat. Mit großer Wahrscheinlichkeit bietet ein Vorrat an Glykogen im Organismus eine gewisse Gewähr für die Aufrechterhaltung der aktuellen Acidität im Vollblut nach intravenöser Zufuhr auch größerer Dosen von Insulin. In Versuch 5 ist es uns beispielsweise nicht gelungen, selbst nach Injektion von 40 Einheiten eines stark wirksamen Insulins beim gut gefütterten Tiere Veränderungen

im p_H des Vollblutes hervorzurufen. Parallel damit geht die im Verhältnis geringe Depression des Blutzuckers. Ein Ähnliches kann aus Versuch 4 entnommen werden. Über die Zusammenhänge zwischen Glykogenvorrat, Puffervorrat und Säuerungsvorgänge im Blute möchten wir uns vorerst nicht äußern.

Aber auch aus den Versuchen an Hungertieren lassen sich einwandfreie Ergebnisse im Sinne einer sicher auftretenden p_H-Verschiebung im Vollblut nach der sauren Seite durch Insulin nicht entnehmen. In Versuch 8 z. B. sind trotz starker Senkung des Blutzuckerspiegels bis auf 0,024 mg-Proz. Verschiebungen in der aktuellen Acidität des Blutes nicht meßbar geworden. Versuch 9 zeigt gleiche Ergebnisse. Nur in den Fällen, bei denen die Insulininjektion auch nach kleinen Dosen zu ausgesprochenen Krämpfen führte, finden wir eine Verschiebung der p_H vom normalen Werte nach der sauren Seite um etwa 0,2.

So ruft die Wirkung des Insulins nach intravenöser Einverleibung im Vollblut des hungernden Kaninchens *meist* ein durch Veränderung des Stoffwechsels bedingtes Auftreten von Säuren hervor, deren Neutralisation vom Blute nicht ohne Vergrößerung der aktuellen Acidität möglich ist. Ob diese Säuerung einzig als Folge der daniederliegenden Atmung und der damit zusammenhängenden CO_2-Überladung des Organismus anzusehen ist, muß bei dem offenbaren Zusammenhang zwischen der Zunahme der aktuellen Acidität und dem Auftreten der hypoglykämischen Krämpfe dahingestellt bleiben. Zwischen der Senkung des Blutzuckers und der p_H-Verschiebung aber scheinen ursächliche Zusammenhänge nicht zu bestehen.

Die elektrometrischen Messungen sind im *Rona*schen Institut der Charité vorgenommen worden. Den Herren Prof. *Rona*, Dr. *Mislowitzer* sowie Fräulein *von Riese* sagen wir auch an dieser Stelle Dank für maßgebenden Rat und bereitwilligste Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Wirkung von Ammonsalzen auf die Hefegärung. IV.

Von

Heinrich Zeller.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 7. Juni 1926.)

Bekanntlich können die Hefezellen Ammonsalze zu ihrem Aufbau verwenden, doch bedürfen sie zu einem guten Gedeihen eines Zusatzes von Bierwürze oder Hefewasser.

Zum Verständnis der Ammonwirkung auf die Hefe muß noch die Stickstoffausscheidung berücksichtigt werden, die eintritt, sobald die Hefe in Wasser kommt. Schon *Thénard* hat diese Tatsache festgestellt. Nach *Mayer* ist dieser N als Gärungsexkrement zu betrachten, nach *Rubner* als Abnutzungsquote.

Die folgenden Versuche sind mit einer größeren Anzahl von verschiedenen Ammonsalzen ausgeführt worden; die Anordnung war dieselbe wie bei früheren Versuchen. Falls für Preßhefe Bierhefe verwandt wurde, ist es vermerkt. Eine Vermehrung der Zellen hat bei den kurzdauernden Versuchen nicht stattgefunden. Die Salze wurden auf ihren Ammongehalt geprüft.

Versuch mit Ammoniumchlorid.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,5 g Ammoniumchlorid, Flasche 3 erhält 1,0 g, Flasche 4 erhält 2,0 g, Flasche 5 erhält 5,0 g, Flasche 6 erhält 10 g, Flasche 7 erhält 20 g. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0
10h45 bis 53′	60	81	85	87	96	84	85
11 27 „ 34	60	68	70	70	72	76	72
1 41 „ 48	60	65	65	63	74	76	71
4 23 „ 32	60	57	61	56	60	75	72

Ammoniumchlorid steigert sofort die Triebkraft der Hefe, maximal um 60 Proz. Die Gärkraft selbst wird durchschnittlich optimal um 25 Proz. gesteigert. Die Höhe der Steigerung ist abhängig von der Konzentration des Salzes. Bei Zusatz von 20 g ist die Höhe der Wirkung überschritten.

Die niederen Konzentrationen nehmen im Laufe des Versuchs ebenfalls in ihrer Wirkung ab. Nur die beiden letzten Spalten erreichen nach achtstündiger Versuchsdauer eine Steigerung, die bis 60 Proz. über die Norm geht. Eine entsprechende Vermehrung der Hefezellen ist in dieser Zeit nicht eingetreten.

Ergebnis. Die Triebkraft wird um 60 Proz. gesteigert, die Gärkraft um 25 Proz.

Versuch mit Bromammonium.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle. Flasche 2 erhält 0,1 g Bromkali, Flasche 3 erhält 0,2 g, Flasche 4 erhält 0,5 g, Flasche 5 erhält 1,0 g, Flasche 6 erhält 2,0 g, Flasche 7 erhält 5,0 g. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0
12h00 bis 45'	90	119	122	126	145	126	118
1 32 „ 42	90	100	98	112	106	104	98
3 10 „ 18	90	94	98	112	104	102	98
4 20 „ 31	90	93	98	114	108	108	105

Bromammonium steigert zu Beginn um 60 Proz. für kurze Zeit, fällt aber rasch ab auf eine durchschnittliche Steigerung von 20 bis 25 Proz., die lange anhält.

Jodammonium weist genau dieselben Ergebnisse auf, weshalb auf seine Tabelle verzichtet wurde. Zu Beginn hat es eine Steigerung von 65 Proz., die schnell abfällt, um auf einer durchschnittlichen Steigerung von 20 bis 25 Proz. zu bleiben.

Ergebnis. Ammoniumbromid und -jodid zeigen zu Beginn eine kurzdauernde Steigerung um 60 bis 65 Proz., die auf eine anhaltende Steigerung von 20 bis 25 Proz. zurückgeht.

Versuch mit Fluorammonium.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,5 mg Fluorammonium, Flasche 3 erhält 1,0 mg, Flasche 4 erhält 2,0 mg, Flasche 5 erhält 4 mg, Flasche 6 erhält 6 mg, Flasche 7 erhält 10 mg. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0.5	1,0	2,0	4,0	6,0	10,0
11h03 bis 24'	45	40	40	38	45	38	30
12 40 „ 46	45	47	47	47	48	46	44
1 35 „ 42	45	48	49	51	51	48	44
3 02 „ 10	45	49	50	53	53	48	44

Fluorammonium zeigt dieselben Verhältnisse wie in früheren Versuchen das Kochsalz oder Jodkali: kleine Hemmung zu Beginn, die abhängig ist von der Konzentration. Nach kurzer Zeit Rückkehr zur Norm, wobei die kleinen Konzentrationen über die Norm für längere Zeit hinausgehen, während die höheren Konzentrationen ohne Einfluß sind oder dauernd schädigen

Bei einer Konzentration mit 20 mg Fluorammonium wird die Hefe schon dauernd geschädigt. Bei 4 mg wird eine maximale Steigerung von 20 Proz. erreicht, während die durchschnittliche optimale Steigerung 15 Proz. beträgt. Bei Versuchen durch kleinste Dosen von Gift eine Gewöhnung zu erzielen, um die hohe Steigerung von *Effront* zu erzielen, war nicht möglich. Vielleicht liegt der Unterschied im Gärungsmedium: *Effront* benutzte Bierwürze, die für diese Versuche nicht anwendbar war.

Ergebnis. Fluorammonium hemmt die Triebkraft und steigert die Gärkraft um 15 Proz. für längere Zeit.

Versuch mit Ammoniumcarbonat und Ammoniumchlorid.

Ammoniumcarbonatlösung und Ammoniumchloridlösung je 5 Proz. 65 g Hefe, 250 g Zucker und 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 ccm Ammoniumcarbonat, Flasche 3 erhält 10 ccm, Flasche 4 erhält 40 ccm, Flasche 5 erhält 2 ccm Ammoniumchlorid, Flasche 5 erhält 10 ccm, Flasche 7 erhält 40 ccm. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	Carb. 2	Carb. 10	Carb. 40	Chlor. 2	Chlor. 10	Chlor. 40
12h00 bis 15'	60	187	200	258	107	163	102
12 51 „ 58	60	80	108	142	76	78	72
1 47 „ 54	60	76	104	122	69	68	66
3 25 „ 32	60	75	115	145	70	65	60

Zum Vergleich wurden Ammoniumchlorid und Ammoniumcarbonat nebeneinander gestellt. Ammoniumcarbonat steigert die Triebkraft um mehr als 300 Proz., Chlorid um 160 Proz. Die Gärkraftsteigerung ist optimal 130 bzw. 26 Proz. Die Steigerung der Triebkraft beim Chlorid dieses Versuchs fiel höher aus, weil die Ablesung geschah, bevor die Gärhöhe erreicht war. Bei beiden Salzen nimmt die Wirkung im Laufe des Versuchs ab.

Ergebnis. Ammoniumchlorid steigert die Triebkraft um 160 Proz., die Gärkraft um 26 Proz.

Ammoniumcarbonat steigert die Triebkraft um 300 Proz., die Gärkraft um 140 Proz.

Versuch mit Ammoniumsulfat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,5 g Ammoniumsulfat, Flasche 3 erhält 1,0 g, Flasche 4 erhält 2,0 g, Flasche 5 erhält 5,0 g, Flasche 6 erhält 10 g, Flasche 7 erhält 20 g. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0
10h45 bis 53'	60	78	83	78	76	51	48
11 27 „ 34	60	66	70	64	68	62	60
1 41 „ 48	60	66	67	68	74	72	82
4 23 „ 32	60	58	62	63	70	78	95

Ammoniumsulfat bewirkt eine Steigerung der Triebkraft bis zu 50 Proz., was in der Tabelle nicht verzeichnet ist. Die allgemeine Steigerung der Gärkraft beträgt 15 Proz. Bei den niederen Konzentrationen nimmt die

Steigerung fortgesetzt ab, bei den höheren aber zu, so daß die letzte Konzentration am Schluß eine Steigerung bis zu 56 Proz. erreicht, ohne daß dabei die Hefezellen sich merklich in ihrer Zahl geändert haben.

Ergebnis. Steigerung der Triebkraft um 50 Proz.

Steigerung der Gärkraft um 20 Proz., die bei der höchsten Konzentration Werte bis 56 Proz. am Schluß erreicht.

Versuch mit Ammoniumnitrat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,1 g Ammoniumnitrat, Flasche 3 erhält 0,2 g, Flasche 4 erhält 0,5 g, Flasche 5 erhält 1,0 g, Flasche 6 erhält 2,0, Flasche 7 erhält 5,0 g. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0
5h00 bis 12′	45	102	80	70	70	80	85
5 37 „ 44	45	50	60	50	50	52	52
6 54 „ 59	45	50	53	53	50	48	43
10 00 „ 08	45	47	49	48	48	47	45

Ammoniumnitrat steigert die Triebkraft um 120 Proz., die Gärkraft um 25 Proz. Am besten wirkt eine Konzentration mit 0,1 bis 1,0 g. Stärkere Konzentrationen wirken schon schädlich. Die Beschleunigung der Gärkraft nimmt bald ab.

Ergebnis. Die Triebkraft wird um 120 Proz., die Gärkraft um 20 bis 25 Proz. gesteigert.

Versuch mit Ammoniummagnesiumsulfat.

75 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,2 g Ammoniummagnesiumsulfat, Flasche 3 erhält 0,5 g, Flasche 4 erhält 1,0 g, Flasche 5 erhält 2,0 g, Flasche 6 erhält 5,0 g, Flasche 7 scheidet aus dem Versuch aus. Temperatur 23°.

Zeit	Kontrolle	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0
3h00 bis 44′	40	46	50	68	70	56
4 13 „ 19	40	46	58	56	58	40
5 49 „ 55	40	46	54	54	52	40
6 20 „ 27	40	49	48	46	45	35

Ammoniummagnesiumsulfat steigert, der Konzentration entsprechend, mit Ausnahme der höchsten, die Triebkraft der Hefe. Das Maximum beträgt 100 Proz. Sobald die Norm die durchschnittliche Gärkraft erreicht, beträgt die Steigerung der mit Ammoniummagnesiumsulfat versetzten Flaschen im Optimum 25 bis 30 Proz. Bei der letzten Flasche ist eine geringe Schädigung infolge der stärkeren Konzentration zu bemerken.

Ergebnis. Ammoniummagnesiumsulfat steigert die Triebkraft um 100 Proz., die Gärkraft um 25 bis 30 Proz.

Versuch mit Ammoniummolybdat und Ammoniumoxalat.

Ausgangslösung: 5 Proz. Ammoniummolybdat und Ammoniumoxalat. 65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 ccm Ammoniummolybdat, Flasche 3 erhält 10 ccm, Flasche 4 erhält 40 ccm, Flasche 5 erhält 2 ccm Oxalat, Flasche 6 erhält 10 ccm, Flasche 7 erhält 40 ccm. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Moly. 2	Moly. 10	Moly. 40	Oxal. 2	Oxal. 10	Oxal. 40
12h05 bis 19′	60	37	44	39	28	21	41
12 50 „ 59	60	92	106	103	92	97	110
1 48 „ 57	60	72	68	75	75	93	98
4 45 „ 56	60	70	61	59	80	102	121

Ammoniummolybdat hemmt zu Beginn und steigert die Gärkraft auf kurze Zeit optimal um 70 Proz., sinkt aber dann plötzlich in seiner Wirkung auf 22 Proz., wobei die Gärflüssigkeit blau wird (Molybdän-Molybdat). Das Absinken geht weiter und erreicht Werte, die bis 20 Proz. unter der Norm liegen.

Ammoniumoxalat hemmt ziemlich stark zu Beginn; rasch setzt dann eine Steigerung ein, die bis 82 Proz. geht. Von neuem tritt ein Absinken um 20 Proz. ein, das von einem Wiederansteigen bis auf 100 Proz. gefolgt ist.

Ergebnis. Ammoniummolybdat hemmt die Triebkraft, steigert auf kurze Zeit die Gärkraft um 70 Proz., dann sinkt die Leistung langsam unter die Norm.

Ammoniumoxalat hemmt die Triebkraft, steigert die Gärkraft um 60 bis 100 Proz. unter An- und Absteigen der Leistung.

Werden die Versuchsergebnisse der verschiedenen Ammonsalze zusammengefaßt, so weisen die Verbindungen mit anorganischen Säuren deutliche Unterschiede auf. Phosphat und Carbonat steigern die Triebkraft um 200 bis 300 Proz. und die Gärkraft um 100 bis 140 Proz., während Chlorid, Bromid, Jodid, Sulfat, Nitrat, Molybdat, Magnesiumsulfat die Triebkraft um etwa 100 Proz. steigern und die Gärkraft um 25 bis 30 Proz. Fluorid und Molybdat hemmen zu Beginn, Fluorid steigert dann die Gärkraft um 15 Proz., während das Molybdat kurze Zeit um 70 Proz. steigert und dann eine stetige Abnahme erleidet, wobei eine Steigerung um 20 Proz. längere Zeit eingehalten wird. Um eine Wirkung von OH- und H-Ionen auszuschließen, habe ich alle verwandten Salze auf $p_H = 6{,}4$ gebracht, da häufig ein Salz stark sauer reagierte. Mit diesen neutralisierten Salzen habe ich dieselben Resultate wie oben bekommen, so daß an eine verschiedene Durchlässigkeit der Zellwand für Ammonsalz zu denken war. Es ist sicher, daß der Hauptfaktor für die bessere Wirkung der Ammonsalze bei der Gärung das Ammoniak selbst ist, da von ihm bekannt ist, daß es in die Zelle eindringt. *Grijns* hat mit einer großen Reihe von Salzen Versuche über die Permeabilität bei Erythrocyten gemacht und findet folgende Ammonsalze permeabel: Fluorid, Chlorid, Jodid. Nicht permeabel sind: Nitrat, Sulfat, Phosphat. Diese Befunde stimmen

mit den für die Hefe gefundenen nicht überein. Für Chlorid und Jodid wird von *Höber* die Permeabilität bezweifelt, da freies Ammon häufig in dem Salz enthalten ist und dadurch eine Auflockerung der Zellhaut entsteht. *Paine* hat an der Hefezelle selbst Permeabilitätsstudien gemacht; er findet, daß aus m/10 Salzlösungen in 3 Stunden von Kochsalz nur Spuren in die Zelle übergehen, ebenfalls von Natriumphosphat, dagegen etwas mehr aus einer Ammonsulfatlösung. Von konzentrierteren Lösungen geht mehr über. Diese wurden hier nicht verwandt, da sie die Gärkraft gleichzeitig beeinträchtigen.

Die nächsten Versuche wurden mit organischen Ammonsalzen angestellt. Das Ammoniumoxalat ist schon mit Ammoniummolybdat zusammen aufgeführt.

Versuch mit Ammoniumbenzoat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,05 g Ammoniumbenzoat, Flasche 3 erhält 0,1 g, Flasche 4 erhält 0,25 g, Flasche 5 erhält 0,5 g, Flasche 6 erhält 1,0 g, Flasche 7 erhält 2,5 g. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	2,5
11h25 bis 37'	45	55	68	70	80	90	75
11 46'	45	58	62	75	74	82	80
11 53	45	51	55	65	66	76	70
12 00	45	51	56	67	70	74	70
12 07	45	51	56	67	68	75	69
12 13	45	52	56	66	66	72	69
12 19	45	52	56	64	65	72	69
12 40 bis 46	45	50	53	58	66	74	68
1 36 „ 43	45	49	52	57	68	76	72
3 24 „ 31	45	49	52	56	67	76	84

Ammoniumbenzoat bewirkt eine Steigerung der Triebkraft bis zu 100 Proz., eine Steigerung der Gärkraft bis zu 60 Proz. Die Wirkung der Steigerung geht langsam bei allen zurück, ausgenommen bei der höchsten Konzentration, die eine dauernd steigende Gärkraft aufweist.

Ergebnis. Ammoniumbenzoat steigert die Triebkraft um 100 Proz., die Gärkraft um 60 Proz., die aber im Laufe des Versuchs stetig fällt.

Versuch mit Ammoniumformiat.

75 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,1 g Ammoniumformiat, Flasche 3 erhält 0,2 g, Flasche 4 erhält 0,5 g, Flasche 5 erhält 1,0 g, Flasche 6 erhält 2,0 g, Flasche 7 erhält 5,0 g. Temperatur 23°.

Zeit	Kontrolle	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0
3h20 bis 47'	40	111	108	130	130	124	68
4 17 „ 23	40	58	69	76	84	77	60
5 50 „ 56	40	55	69	84	96	86	70
8 20 „ 27	40	55	62	78	98	90	80

Ammoniumformiat steigert die Triebkraft von Flasche 0,1 bis 1,0 der Konzentration entsprechend; höhere Konzentrationen fallen ab. Das Maximum geht bis zum Vierfachen der Norm. Sobald die Norm das Maximum der Gärkraft erreicht hat, bleibt für die Ammoniumformiatflaschen nur noch eine maximale Steigerung von 120 Proz., die die Tendenz zur weiteren Senkung bis auf 100 Proz. hat. Später zeigt sich eine erneute Steigerung auf 140 Proz.

Ergebnis. Ammoniumformiat steigert die Triebkraft um 300 Proz., die Gärkraft um 100 bis 150 Proz., wobei nach einer ursprünglichen Steigerung um 120 Proz. ein Fallen eintritt, darauf ein erneutes Steigen.

Versuch mit Ammoniumacetat, Natriumcitrat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen abgefüllt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 ccm 5proz. Ammoniumacetatlösung, Flasche 3 erhält 10 ccm 5proz. Ammoniumphosphatlösung, Flasche 4 erhält 40 ccm, Flasche 5 erhält von einer 5proz. Natriumcitratlösung 2 ccm, Flasche 6 erhält 10 ccm, Flasche 7 erhält 40 ccm. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	Amm. 2	Amm. 10	Amm. 40	Citr. 2	Citr. 10	Citr. 40
11h10 bis 23'	60	85	96	110	68	44	16
12 15'	60	96	132	152	85	86	62
1 51 „ 2h01'	60	76	110	135	70	70	64
3 42 „ 52'	60	71	107	134	73	70	62

Ammoniumacetat zeigt eine Steigerung der Triebkraft bis 150 Proz. und eine Steigerung der Gärkraft bis 135 Proz. Kleinere Dosen Salz weisen nach kurzer Zeit eine Abnahme der Steigerung auf.

Natriumcitrat hemmt zu Beginn entsprechend der Konzentration. Die kleinste Dosis steigert die Triebkraft um 40 Proz. und die Gärkraft um 25 Proz.

Versuch mit Ammoniumcitrat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 0,05 g Ammoniumcitrat, Flasche 3 erhält 0,1 g, Flasche 4 erhält 0,25 g, Flasche 5 erhält 0,5 g, Flasche 6 erhält 1,0 g, Flasche 7 erhält 2,5 g. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	2,5
11h04 bis 25'	45	45	45	20	20	10	5
11 46 „ 53	45	42	36	19	11	1	0
12 40 „ 46	45	56	45	24	20	6	2
3 24 „ 33	45	68	80	35	30	14	3

Ammoniumcitrat hemmt entsprechend der Konzentration; die beiden letzten Konzentrationen wirken stark giftig, was um so auffälliger ist, als Natriumcitrat in derselben Konzentration keine Schädigung bewirkt. Die beiden ersten Spalten, 0,05 und 0,1, steigern langsam und erreichen optimal eine Steigerung bis 80 Proz. Die nächste Konzentration hemmt dauernd,

so daß zwischen einer möglichen Steigerung und einer Hemmung kein eigentlicher Übergang besteht.

Ergebnis. Ammoniumcitrat bewirkt in kleinen Dosen eine langsam zunehmende Steigerung bis 80 Proz. Bei nur wenig höheren Dosen tritt Schädigung auf. Zu Beginn besteht eine Hemmung.

Versuch mit Ammoniumrhodanat und Ammoniumtartrat.

Ausgegangen wird von einer 5proz. Ammonium-rhodanat- und -tartratlösung. 65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 ccm Rhodanat, Flasche 3 erhält 10 ccm, Flasche 4 erhält 40 ccm, Flasche 5 erhält 2 ccm Tartrat, Flasche 6 erhält 10 ccm, Flasche 7 erhält 40 ccm. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Rhod. 2	Rhod. 10	Rhod. 40	Tart. 2	Tart. 10	Tart. 40
12h05′ bis 21′	60	28	29	26	25	23	16
12 40 „ 49	60	65	75	70	70	100	72
1 48 „ 57	60	66	74	70	79	90	83
4 45 „ 56	60	65	65	60	75	90	110

Ammoniumrhodanat bewirkt zu Beginn eine Hemmung über 50 Proz., die langsam in eine Steigerung mit einem einmaligen Optimum von 50 Proz. übergeht. Schnell tritt dann ein Abfall auf 25 Proz. ein, der dauernd fortschreitet.

Ammoniumtartrat hemmt zu Beginn, steigert dann die Gärkraft um 60 Proz., die vorübergehend etwas fällt, um dann 80 Proz. zu erreichen.

Ergebnis. Ammoniumrhodanat hemmt zu Beginn, steigert dann auf 50 Proz., darauf langsames Abfallen auf 0 Proz.

Ammoniumtartrat hemmt zu Beginn, steigert bis auf 80 Proz. später.

Werden die Versuche mit den organischen Salzen zusammengefaßt, so ergibt sich Ähnliches wie bei den anorganischen. Formiat und Acetat steigern die Triebkraft um 200 bis 300 Proz., die Gärkraft um 100 bis 140 Proz. Citrat, Oxalat, Tartrat hemmen zu Beginn und steigern langsam die Gärkraft bis zu etwa 80 Proz. Benzoat steigert die Triebkraft um 100 Proz., die Gärkraft zu Beginn um 60 Proz., wonach die Wirkung bis auf 30 Proz. zurückgeht; Rhodanat hemmt zu Beginn, steigert dann die Gärkraft um 80 Proz. für kurze Zeit, dann fällt die Wirkung allmählich auf 25 Proz. Mit organischen Salzen hat *Paine* keine Versuche gemacht, so daß damit kein Vergleich möglich ist. Zieht man die Resultate von *Grijns* mit der Permeabilität der Erythrocyten heran, so ergibt sich, daß Ammoniumoxalat, -benzoat, -acetat für Erythrocyten durchgängig sind, während Ammoniumrhodanat undurchgängig ist. Auch hier ist kein richtiger Zusammenhang von Hefe und Erythrocyten in bezug auf die Durchlässigkeit der Ammonsalze und auf die Gärwirkung festzustellen.

Faßt man die Resultate der organischen und anorganischen Salze zusammen, so ergibt sich folgendes:

1. Steigerung der Triebkraft um 200 bis 300 Proz. und Steigerung der Gärkraft um 100 bis 140 Proz. durch Phosphat, Carbonat, Acetat, Formiat.

2. Steigerung der Triebkraft um 100 Proz. und Steigerung der Gärkraft um 25 bis 30 Proz. durch Chlorid, Bromid, Jodid, Sulfat, Nitrat, Magnesiumsulfat, Benzoat.

3. Hemmung erst, dann Steigerung der Gärkraft langsam bis 80 Proz. durch Citrat, Oxalat, Tartrat (bei Citrat tritt schon mit mäßigen Dosen Giftwirkung auf).

4. Hemmung erst, dann kurze Steigerung der Gärkraft auf 80 Proz. mit Absinken auf etwa 25 Proz. durch Molybdat, Rhodanat.

Vom Ammoniumfluorid kann abgesehen werden, da es infolge seiner Giftigkeit eine etwas anders geartete Stellung einnimmt.

Versuch mit Ammoniumcarbonat, -acetat, -phosphat, -oxalat, Natrium formicium, Urin bei 33°.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 g Ammoniumcarbonat, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumacetat, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumphosphat, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 6 erhält 2 g Natriumformiat, Flasche 7 erhält 50 ccm Urin. Temperatur 33°.

Zeit	Kontrolle	Carbonat	Acetat	Phosphat	Oxalat	Formiat	Urin
1h00 bis 04′	45	88	62	75	76	61	78
1 23 „ 27	45	78	78	80	76	65	89
2 14 „ 17	45	80	80	74	71	62	82
2 40 „ 44	45	90	87	76	82	66	92

Dieser Versuch wurde bei einer Temperatur von 33° angestellt, um zu prüfen, wie die Steigerung durch Ammonsalze bei höherer Temperatur sich verhält. Die nächste Tabelle zeigt bei derselben Hefe mit denselben Salzen die Wirkung bei 20°.

Es ergibt sich, daß Kontrolle 33° durchschnittlich dreimal so schnell arbeitet wie Kontrolle 20°. Carbonat 33° steigert in der ersten Zeit um 80 Proz., Carbonat 20° um 135 Proz. Für Acetat sind die entsprechenden Zahlen 80 bis 135 Proz., für Phosphat 70 bis 140 Proz., für Oxalat 60 bis 120 Proz., für Formiat 40 bis 70 Proz., für Urin 90 bis 120 Proz. Es nimmt überall die Höhe der Steigerung ab, und zwar um 40 bis 50 Proz. Das heißt, wenn die Hefe dreimal schneller arbeitet, arbeitet die Steigerung durch Ammonsalze nur um 50 Proz. schneller. Bei 15° findet sich das umgekehrte: Die Steigerung durch Ammonsalze hat mit der Steigerung durch Wärme nicht denselben Angriffspunkt.

Versuch mit Ammoniumcarbonat, -acetat, -phosphat, -oxalat, Natriumformiat, Urin bei 20°.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 g Ammoniumcarbonat, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumchlorid, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumphosphat, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 6 erhält 2 g Natriumformiat, Flasche 7 erhält 50 ccm Urin.

Zeit	Kontrolle	Carbonat	Acetat	Phosphat	Oxalat	Formiat	Urin
12h30 bis 45′	45	50	68	76	62	17	2
2 14 „ 26	45	113	135	106	100	78	98
4 02 „ 14	45	115	120	120	100	77	96
4 59 „ 5h10′	45	106	111	100	90	70	94

In dieser Tabelle ist die Gärkraft der einzelnen Substanzen aufgezeichnet, die nachher gemischt werden. Carbonat steigert die Wirkung um 135 Proz., Acetat um 155 Proz., Phosphat um 140 Proz., Oxalat um 120 Proz., Natriumformiat um 70 Proz., Urin um 120 Proz. Gleichzeitig ist sie die Paralleltabelle zur vorhergehenden.

Versuch mit Mischungen.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält Ammoniumcarbonat + Natriumformiat (2 g + 2 g), Flasche 3 erhält Ammoniumcarbonat + Urin (2 g + 50 ccm Urin), Flasche 4 erhält Natriumformiat + Urin (2 g + 50 ccm Urin), Flasche 5 erhält Ammoniumchlorid + Natriumphosphat (2 g + 5 g), Flasche 6 erhält Ammoniumchlorid + Natriumformiat (2 g + 2 g), Flasche 7 erhält Ammoniumchlorid + Natriumacetat (2 g + 5 g). Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Carb. + Form.	Carb. + Urin	Form. + Urin	Cl + PO_4	Cl + Form.	Cl + Acet.
1h24 bis 37′	45	75	73	71	60	81	48
2 14 „ 26	45	102	110	120	100	102	90
4 02 „ 14	45	100	116	156	92	110	90
4 59 „ 5h10′	45	96	120	134	92	100	90

Carbonat wird durch Zusatz von Natriumformiat in seiner Wirkung um 20 Proz. gehemmt, während durch Zusatz von Urin eine kleine Steigerung auftritt. Die Steigerung von Natriumformiat und Urin soll hier nicht besprochen werden.

Chlorid + Natriumformiat ergibt eine Steigerung bis 120 Proz., Chlorid + Natriumphosphat und Chlorid + Natriumacetat eine solche von 100 Proz.

Diese steigernde Wirkung auf die Hefe hat ihre Ursache in der Bildung eines Ammonsalzes, das die Hefe verwerten kann. Bei der Mischung von Ammoniumchlorid mit den oben genannten drei Salzen bildet sich zum Teil Ammoniumphosphat, -formiat, -acetat.

Versuch mit Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Harnstoff zusammen mit Kaliumchlorat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 5 g Ammoniumchlorid, Flasche 3 erhält 5 g Ammoniumchlorid zusammen mit 6 g Kaliumchlorat, Flasche 4 erhält 5 g Ammoniumsulfat, Flasche 5 erhält 5 g Ammoniumsulfat zusammen mit 6 g Kaliumchlorat, Flasche 6 erhält 5 g Harnstoff, Flasche 7 erhält 5 g Harnstoff zusammen mit 6 g Kaliumchlorat. Die Auflösung der Salze geschieht in 100 g Wasser. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	Chlorid	Chlorid Chlorat	Sulfat	Sulf. Chlorat	Harnstoff	Harnst. Chlorat
12h30 bis 1h06′	30	24	40	48	30	15	10
1 54 „ 2 01	30	41	42	47	46	33	28
2 44 „ 51′	30	47	50	54	53	42	37
4 28 „ 34	30	36	43	45	47	36	40

Kaliumchlorat steigert die Gärwirkung der Hefe nicht. Ammoniumchlorid, -sulfat, Harnstoff steigern die Wirkung der Gärkraft durchschnittlich um 45 bis 60 bis 30 Proz. Zusatz von Kaliumchlorat bewirkt beim Chlorid eine geringe Steigerung um 10 bis 15 Proz., beim Sulfat ist es ohne Wirkung und beim Harnstoff entsteht eine geringe Hemmung. Bei der Fortsetzung des Versuchs tritt bei allen drei mit Kaliumchlorat versetzten Hefen eine mäßige Steigerung auf.

Versuch mit Ammoniumphosphat und Natriumformiat.

65 g Hefe, 250 g Zucker, werden der zweistündigen Gärung unterworfen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 g Ammoniumphosphat, Flasche 3 erhält 2 g Natriumformiat, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumphosphat und 2 g Natriumformiat, Flasche 5 erhält 5 g Ammoniumphosphat, Flasche 6 erhält 5 g Natriumformiat, Flasche 7 erhält 5 g Ammoniumphosphat und 5 g Natriumformiat. Temperatur 22°.

Zeit	Kontrolle	2 g Ammoniumphosphat	2 g Natriumformiat	2 + 2 Ammoniumphosphat + Natriumformiat	5 g Ammoniumphosphat	5 g Natriumformiat	5 + 5 Ammoniumphosphat + Natriumformiat
10h30 bis 11h12′	30	96	53	76	94	32	60
11 35 „ 44′	30	70	56	58	72	51	47
12 12 „ 18	30	70	50	54	75	57	43
1 52 „ 57	30	63	47	52	66	47	44

2 g Ammoniumphosphat allein steigern die Triebkraft um 200 Proz. und die Gärkraft um 140 Proz. 5 g Ammoniumphosphat steigern die Trieb- und Gärkraft in derselben Höhe, 2 g Natriumformiat steigern die Triebkraft um 130 Proz. und die Gärkraft um 75 Proz. 5 g Natriumformiat zeigen eine Steigerung der Triebkraft nur um 70 Proz. und eine Steigerung der Gärkraft um 90 Proz. Werden je 2 g Ammoniumphosphat mit 2 g Natriumformiat zusammengebracht, so erzeugt die Hefe nur etwas mehr Kohlensäure, als dem Natriumformiat allein entspricht; beim Zusammenbringen von je 5 g sogar weniger als dem Natriumformiat allein entspricht.

Versuch mit Ammoniumacetat und Ammoniumphosphat.

75 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 bis 7 erhalten je 2,0 g Ammoniumacetat. Dazu erhält Flasche 3 0,2 g Ammoniumphosphat, Flasche 4 0,5 g, Flasche 5 1,0 g, Flasche 6 2,0 g. Flasche 7 5,0 g. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Acetat	Acetat + 0,2 Phosphat	Acetat + 0,5 Phosphat	Acetat + 1,0 Phosphat	Acetat + 2,0 Phosphat	Acetat + 5,0 Phosphat
2h50 bis 3h09′	30	63	88	88	84	75	32
3 38 „ 44′	30	58	70	72	72	70	53
5 47 „ 6h02′	30	62	73	75	73	73	58
6 38 „ 44′	30	60	72	75	75	72	59

Ammoniumacetat ruft in einer Dosis von 2 g eine Steigerung der Triebkraft um 170 Proz., eine Steigerung der Gärkraft um 100 Proz. hervor. Ein kleiner Zusatz von 0,2 Ammoniumphosphat ruft eine Steigerung der Triebkraft bis 190 Proz. und eine Steigerung der Gärkraft bis 140 Proz. hervor. Ein stärkerer Zusatz von Ammoniumphosphat hat bei 0,5 und 1,0 nur eine geringe Erhöhung der Resultate von 0,2 zur Folge; Zusatz von 2,0 Phosphat ergibt dasselbe wie 0,2, und 5,0 Phosphat zeigt eine geringere Wirkung als Acetat allein.

Ergebnis. Ein kleiner Zusatz von Ammoniumphosphat kann die Wirkung von Ammoniumacetat um 40 Proz. steigern.

Dasselbe Resultat ließ sich mit Ammoniumcarbonat + Ammoniumphosphat nachweisen, weshalb von einer Wiedergabe abgesehen wird.

Beim Mischen von solchen Ammonsalzen, die nur eine geringe Steigerung aufweisen, mit anderen Salzen ist, wie die vorangehenden Versuche zeigen, es möglich, eine hohe Steigerung zu erreichen, wenn das zugefügte Salz eine Säure enthält, die als Ammoniakverbindung eine hohe Steigerung bewirkt. Sonst kommt nur die geringe Steigerung von 25 Proz. zustande. Es ist für die Steigerung gleichgültig, welche Salze noch vorhanden sind, wenn nur die Möglichkeit besteht, daß eines der hoch steigernden Salze sich aus den zugefügten bilden kann. Ich möchte dabei aufmerksam machen, daß die Ammonsalzsteigerung an verhältnismäßig hohe Dosen gebunden ist (0,5 bis 5,0 Prom.), und in einer solchen Dosis muß das Salz in der Mischung vorhanden sein, um die hohe Beschleunigung zu bewirken.

Versuch mit Bierhefe.

100 g Bierhefe, 200 g Zucker, 6300 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 g Ammoniumchlorid, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumnitrat, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumrhodanid, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumbenzoat, Flasche 6 erhält 2 g Ammoniumsulfat, Flasche 7 erhält 2 g Kaliumbiphosphat. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Chlorid	Nitrat	Sulfat	Rhodan	Benzoat	K_2HPO_4
4h05 bis 20′	45	24	22	40	102	6	20
5 35 „ 43	45	56	55	68	65	9	36
6 40 „ 48	45	52	50	60	55	11	40

Diese gekürzte Tabelle der Bierhefewirkung zeigt ungefähr dieselben Resultate wie die Preßhefe. Am auffallendsten ist aber die verschiedene Wirkung von Benzoat; bei der Preßhefe kommt eine anfängliche Steigerung bei der Triebkraft zum Vorschein, mit nachfolgender mäßiger Steigerung bis um 70 Proz. der Gärkraft. Hier schädigt Benzoat die Hefe stark, so daß eine Gärung kaum eintritt. Rhodan hemmt die Preßhefe, während hier eine ziemliche Steigerung der Triebkraft einsetzt. Auch die Hemmung bei Chlorid, Sulfat und Nitrat zu Beginn ist auffällig. Die mittlere Steigerung der Gärkraft beträgt ungefähr 25 bis 30 Proz., also soviel wie bei der Preßhefe. Kaliumbiphosphat zeigt eine starke Hemmung, die nur langsam überwunden wird.

Ergebnis. Chlorid, Sulfat, Nitrat hemmen die Triebkraft, steigern die Gärkraft der Hefe um 25 bis 30 Proz.

Rhodanat steigert die Triebkraft der Hefe um über 100 Proz., die Gärkraft um 35 Proz.

Benzoat schädigt die Hefe, so daß eine nur geringe Gärung auftritt.

Versuch mit Bierhefe.

100 g Bierhefe, 200 g Zucker, 6300 g Wasser werden der halbstündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2 g Ammoniumcarbonat, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumacetat, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumcitrat, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumformiat, Flasche 6 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 7 erhält Ammoniumphosphat. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Carbonat	Acetat	Citrat	Formiat	Oxalat	Phosphat
4h05 bis 20'	45	37	50	70	71	60	46
5 35 „ 43	45	76	96	82	92	72	87
6 40 „ 48	45	85	90	80	84	65	76

Diese Tabelle zeigt den Parallelversuch zu dem vorigen. Im Gegensatz zur Preßhefe tritt bei Carbonat, Acetat, Phosphat keine Steigerung der Triebkraft auf, wohl aber beim Citrat, Formiat und Oxalat. Die optimale Steigerung der Gärkraft beträgt ungefähr 100 Proz. bei Carbonat, Acetat, Formiat und Phosphat, während das Oxalat etwas zurückbleibt.

Ergebnis. Die Triebkraft wird durch Citrat um 56 Proz., durch Formiat um 70 Proz., durch Oxalat um 33 Proz. gesteigert, während die Gärkraft durch Carbonat um 88 Proz., bei Acetat um 110 Proz., bei Citrat um 90 Proz., bei Formiat um 100 Proz., bei Oxalat um 66 Proz, bei Phosphat um 92 Proz. gesteigert wird.

Die Wirkung der Ammonsalze auf Preß- und Bierhefe ist nicht dieselbe. Benzoat wirkt bei der Bierhefe giftig, bei der Preßhefe nicht; Citrat wirkt bei der Preßhefe giftig, bei der Bierhefe nicht. Rhodanat steigert die Triebkraft der Bierhefe, hemmt die Triebkraft der Preßhefe. Im Gegensatz zur Preßhefe hemmen bei der Bierhefe die anderen Ammonsalze die Triebkraft. Dasselbe Verhalten bei beiden Hefen in bezug auf die Steigerung der Gärung zeigen ungefähr: Carbonat, Acetat, Phosphat, Formiat, Oxalat, Chlorid, Sulfat, Nitrat, Rhodanat.

Versuch mit Bierhefe.

1000 ccm Bierhefeaufschwemmung werden 8 Stunden gewaschen, dann mit 500 g Zucker und 12600 g Wasser der halbstündigen Gärung überlassen und auf 14 Flaschen verteilt. Zu diesem Versuch werden sieben Flaschen verwandt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2,0 g Ammoniumcarbonat, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumacetat, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumbenzoat, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 6 erhält 2 g Ammoniumphosphat, Flasche 7 erhält 2 g Ammoniumformiat. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Carbonat	Acetat	Benzoat	Oxalat	Phosphat	Formiat
8h12 bis 18'	20	5	5	4	30	21	51
8 30 „ 36	20	22	25	6	165	103	69
8 47 „ 53	20	55	58	10	141	144	85
9 48 „ 52	20	55	57	15	96	90	65

Bierhefe zeigt hier von ihrem sonstigen Verhalten eine Abweichung. Die Ursache liegt im Waschen mit *kalkhaltigem Wasser*. Dadurch wird die Zuckeraufnahme verändert. Das Benzoat, das sonst eine Hemmung von etwa 80 Proz. aufweist, zeigt nur eine Hemmung von 50 Proz. Carbonat und Acetat haben zu Beginn eine stärkere Hemmung, steigern später aber höher bis 175 Proz. Formiat steigert die Gärkraft bis 240 Proz., erleidet dann ein Fallen, um nachher auf 300 Proz. zu steigern. Oxalat und Phosphat steigern die Gärkraft durchschnittlich um 500 Proz., maximal bis 600 Proz.

Ergebnis. Die Gärung von mit kalkhaltigem Wasser gewaschener Bierhefe wird durch Oxalat und Phosphat bis um 500 Proz. gesteigert, durch Carbonat und Acetat um 175 Proz., durch Formiat wechselnd zwischen 150 bis 300 Proz. Benzoat hemmt um 50 Proz.

Versuch mit Bierhefe.

Dieselbe Hefe des vorigen Versuchs wird benutzt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 20 mg Ammoniumfluorid, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumchlorid, Flasche 4 erhält 2 g Ammoniumjodid, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumcitrat, Flasche 6 erhält 2 g Ammoniumnitrat, Flasche 7 erhält 2 g Ammoniumrhodanid. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Fluorid	Chlorid	Jodid	Citrat	Nitrat	Rhodanid
8h12 bis 18'	20	14	10	12	6	14	20
8 30 „ 36	20	9	19	16	27	20	27
8 47 „ 53	20	9	34	31	47	34	52
9 48 „ 52	20	10	38	34	52	37	43

Die hier zugesetzten Ammonsalze zeigen zu Beginn beinahe alle eine Hemmung, die nur langsam in eine Steigerung übergeht. Fluorid bleibt auf einer Hemmung von 50 Proz., Chlorid steigert um 70 Proz., Citrat um 140 Proz , ebenfalls Rhodan, Nitrat um 85 Proz., Jodid um 70 Proz. Das Rhodan zeigt die Tendenz, langsam abzufallen, während die anderen langsame Steigerung aufweisen.

Ergebnis. Die Bierhefegärung wird durch Jodid, Chlorid, Nitrat um 70 bis 90 Proz. gesteigert, durch Rhodan und Citrat um 140 Proz., während Fluorid um 50 Proz. hemmt.

Die Ursache dieses andersartigen Verhaltens liegt wahrscheinlich in einer *Kalkanlagerung* der Hefe. Gifte werden weniger durchgelassen, was

die geringere Hemmung durch Benzoat und Fluorid beweist. Vielleicht spielt bei letzterem eine Bildung von ungiftigem Calciumfluorid eine Rolle. Citrat und Oxalat steigern hoch, weil sie den Kalk binden. Diese hohe Steigerung ist jedoch nur scheinbar, weil die Kontrolle gehemmt ist.

Grundlage der Steigerung.

Die Ursache der Steigerung der Gärkraft durch Ammonsalze kann außerhalb der Zelle liegen oder an ihrer Oberfläche oder im Zellinnern.

1. *Außerhalb.* Der Zucker kann durch Ammonsalze in eine Form gebracht werden, eventuell mit Hilfe von Zellausscheidungen, daß die Zelle ihn leichter aufnehmen kann. Es kann aber auch an eine Esterbildung gedacht werden, so daß das Ammonsalz dieses Esters leichter resorbiert werden kann.

2. *An der Oberfläche.* Es wäre möglich, daß die Ammonsalze an der Zelloberfläche leichter adsorbiert werden, dadurch die Durchlässigkeit ändern oder aber ein Ferment aktivieren oder eluieren.

3. *Im Zellinnern.* Hier besteht die Möglichkeit einer direkten Wirkung auf die Zymase oder auf die Zelle allein, wobei die Möglichkeit einer Zellvermehrung auszuschließen ist.

Über die Art und Weise der Zuckeraufnahme durch die Hefezelle ist nichts bekannt. Von anderen Zellen ist nachgewiesen, daß sie Zucker nicht oder nur langsam aufnehmen. Bei der Hefezelle lassen sich direkte Versuche nicht anstellen, da sie den Zucker sofort vergärt. Nur indirekt ist der Nachweis möglich. Es dauert eine gewisse Zeit, bis die Hefegärung eintritt und auf ihre volle Höhe kommt. Diese Faktoren sind bei verschiedenen Hefen verschieden, dazu von der Temperatur und eventuellen Zusätzen abhängig. Der Zuckerschwund aus der Gärflüssigkeit und der Eintritt der Kohlensäureentwicklung folgen sich unmittelbar, so daß mit dem Eintritt der letzteren auf die Resorption von Zucker durch die Hefe geschlossen werden kann. Wohl hat *Euler* eine Differenz der Drehungsabnahme (Zuckerschwund) zur entstandenen Kohlensäure (vergorener Zucker) festgestellt, die aber bei Bestimmung des Zuckers durch Reduktion anstatt durch Drehung kaum nachzuweisen ist. Es ist nun möglich nachzuweisen, daß vor Eintritt der Zuckerresorption die bekannte Stickstoffausscheidung stattfindet; sie nimmt langsam zu. Bei beginnender Gärung nimmt sie etwas ab oder behält ihre Höhe bis zum Ende der Gärung. Besonders zu Beginn konnte ich stets etwas Ammoniak nachweisen, das aber mit eintretender Gärung sich verringerte. Wird die Temperatur erhöht, so tritt mehr N aus, die Gärung verläuft schneller, wie schon *Rubner* fand. Er fand auch, daß, wenn der Hefe dieser ausgeschiedene N weggenommen wird, die Hefe wieder neuen ausscheidet, aber weniger als zuvor; dabei wird die Gärkraft auch geringer. Ein Zusammenhang mit der eigent-

lichen Gärung dieses N wurde immer abgelehnt, seine eventuelle Bedeutung für die Resorption des Zuckers außer acht gelassen. Alle Faktoren, die ihn vermehren, können die Gärung steigern, alle, die ihn vermindern, hemmen die Gärung.

Wird die gerade in Gärung befindliche Hefe zentrifugiert und die klare Flüssigkeit im Vakuum eingedampft, dann mit Äther extrahiert, der Extrakt mit Wasser aufgenommen, so bleibt eine geringe Menge Substanz, die Kupfersulfat in Natronlauge mit blauer Farbe löst und Ammoniak enthält. Reduktion war nicht nachzuweisen, wenn auch statt Rübenzucker Traubenzucker verwandt wurde. Bei der kleinen Menge Substanz war eine weitere genaue Untersuchung nicht möglich. Die nächste Tabelle zeigt den Einfluß von Temperatur und Zucker auf die N-Ausscheidung der Hefe.

Je 30 g Hefe werden in 500 ccm Wasser bzw. 5 proz. Zuckerlösung aufgeschwemmt, dann sofort NH_3 und N bestimmt; nach einer halben Stunde und anderthalb Stunden wird dasselbe wiederholt. Zur Bestimmung werden je 50 ccm verwandt.

Zeit	Hefe in Wasser bei 15°		Hefe in Wasser bei 30°		Hefe in Zuckerlösung bei 15°	
	NH_3	Gesamt-N	NH_3	Gesamt-N	NH_3	Gesamt-N
Sofort	0,0	0,3	0,1	0,6	0,15	0,6
Nach $^1/_2$ Std. .	0,1	0,6	0,15	0,8	0,1	0,8
Nach $1^1/_2$ Stdn.	0,1	0,7	0,1	0,8	0,1	0,7

Die Hefe wurde vorher gewaschen und dann gepreßt, bis sie wieder halbfest wurde; zum Versuch wurde sie erst einige Stunden nach Ablauf der Pressung verwandt, weil die frisch gewaschene Hefe schneller gärbereit ist. Eine kleine Menge N ist wohl nicht auswaschbar, sie erscheint unter den 0,3 Gesamt-N in der dritten Spalte der Tabelle. Wie schon erwähnt, wird die N-Ausscheidung durch eine Temperaturerhöhung oder Zusatz von Zucker beschleunigt und vermehrt.

Durch Wegnahme des ausgeschiedenen N wird die Gärung vorübergehend bis um 50 Proz. verringert; Zusatz des weggenommenen N bewirkt schnelle Wiederherstellung der früheren Gärkraft. Wird aber das erste Waschwasser zugesetzt, dann entsteht eine Hemmung, da wahrscheinlich von der früheren Gärung hemmende Bestandteile sich darin befinden. Eine Beschleunigung durch einen Überschuß von Gärwasser war ohne Erfolg. Ich möchte zur Technik der N-Bestimmung noch bemerken, daß ich die Hefe häufig bewegte, um möglichst viel N in die Flüssigkeit zu bekommen, auch darf die Hefe nicht zu konzentriert sein. War Zucker beigegeben, so verschwand beim richtigen Einsetzen der Gärung ein Teil des N, besonders vom NH_3. Das deutet darauf hin, daß mit dem Zucker ein Teil des N in die Zelle geht, um dann

von neuem den Kreislauf zu beginnen. Wird der ausgeschiedene N durch Ammonsalz ersetzt, so wird die entstandene Hemmung nicht behoben.

Es war daher zu untersuchen, welchen Einfluß das Coferment auf Ammonsalz + Zucker hat.

Versuch mit Coferment.

Das Coferment wird aus toluolisierter, leicht getrockneter Bierhefe hergestellt. Bei der Destillation mit Ammoniak enthalten 30 ccm Coferment 3,55 n/10 NH_3. Traubenzuckerlösung hat 6,4 Proz. Zucker.

	NH_3	Zucker Proz.
Zuckerlösung 50 ccm + 50 ccm Wasser	—	3,25
„ 50 „ + 50 „ Coferment . . .	3,5	3,1
Coferment 50 + 5,6 n/10 NH_4-Formiat	9,1	—
„ 50 + 5,6 n/10 NH_4-Jodid	9,05	—
„ 49 + 50 Zucker + Formiat	8,6	3,0
„ 49 + 50 „ + Jodid	8,8	3,0

Wird Coferment mit Zuckerlösung zusammengebracht, so wird ein kleiner Teil des im Coferment enthaltenen Ammoniaks gebunden, und der Zucker nimmt um 0,15 Proz. ab. Wird Coferment mit Ammonsalzen zusammengebracht, so bleibt die Summe des Ammoniaks frei abdestillierbar. Werden dagegen Zucker, Coferment und Ammonsalz zusammengebracht, so nimmt der Zucker um 0,25 Proz. ab, ebenfalls das Ammoniak. Es ist daher sicher anzunehmen, daß durch das Coferment eine Umänderung des Ammoniaks mit dem Zucker zusammen erfolgt.

Palladin, Iwanoff, Kostytschew, Brilliant nahmen an oder hatten als sicher eine Bindung von Ammoniak mit Zucker gefunden. Der Prozeß ging bei Zugabe von Hefeautolysat schneller vonstatten als ohne dasselbe. Hier findet eine ähnliche Bindung statt, und es ist nicht von der Hand zu weisen, daß sie auch in der Hefe vorkommt. Das Coferment als solches tritt dabei aber nicht in die Außenflüssigkeit, so daß der Einfluß der Ammonsalze auf die Hefegärung sich nicht in dieser Weise äußert.

Das Hexosediphosphat von *Harden* und *Young* legt die Frage nahe, ob die Hefe nicht imstande ist, mit anderen Säuren als mit der Phosphorsäure Ester zu bilden. Zwar kommt dann die Frage, ob es für die Hefe zweckmäßig wäre, solche Ester zu bilden, da sie Hexosediphosphat nicht vergären kann, aber auch nicht gärunwirksam wird *(Harden, Neuberg)*. Nach *Paine* ist es lipoidlöslich, was aber *Maclean* verneint. *Paine* selbst findet, daß Hexosediphosphat in mäßiger Konzentration *kaum durchgängig* ist; in stärkerer Konzentration dringt es nach einigen Stunden ein, aber die Hefe gärt nicht mehr. Aber es ist möglich, daß ein Hexosemonophosphat sich bildet, das sich anders verhält. Wird zu Coferment + Zucker Ammoniumoxalat zugesetzt, dann fällt nach 2 Stunden auf Zusatz von Calciumchlorid kein Oxalat aus, während ein sofortiger Zusatz einen reichlichen Nieder-

schlag hervorruft. Dasselbe gilt für Ammoniumphosphat; auch hier entsteht nach zweistündigem Stehen kein Niederschlag auf Magnesiamixtur, während sofortiger Zusatz einen Niederschlag hervorruft. Bei Ammoniumchlorid, -sulfat, -rhodanid ist keine Veresterung, oder was wahrscheinlicher ist, keine Komplexbildung möglich. Letzteres ist sicher anzunehmen, da die Bindung von Phosphat und Oxalat leicht reversibel ist. Nach kurzer Zeit beginnt nach Zusatz von Calciumchlorid sich ein allmählich stärker werdender Niederschlag zu bilden. Es gelang mir nicht, den Oxalatkomplex als solchen zu isolieren.

Es war dann noch zu untersuchen, ob der von der Hefe ausgeschiedene und ihr entzogene Stickstoff nicht teilweise durch Ammonsalze zu ersetzen war. Bei der Untersuchung von gewöhnlicher Hefe war kein Erfolg nachzuweisen. Die beiden nächsten Versuche sollen zeigen, ob bei leicht geschädigter Hefe die Ammonsalzwirkung in derselben Stärke auftritt. Wie *Euler* nachwies, gibt solche Hefe ihr Coferment leichter ab; daher wurde im Parallelversuch eine einmal ausgewaschene Hefe benutzt. Es zeigte sich, daß die Wirkung von Ammonsalzen auf solche leicht getrocknete Hefe schwächer ist als früher. Nur das Phosphat arbeitet besser, ebenfalls das Chlorid. Bei der getrockneten und gewaschenen Hefe ist eine Hemmung bei der Kontrolle festzustellen. Bezogen auf die eigene Kontrolle arbeiten die Ammonsalze wie bei der nicht gewaschenen Hefe; wird aber Ammonsalz mit Ammonsalz verglichen, so arbeiten die Salze bei der gewaschenen Hefe schlechter. Nur das Formiat arbeitet später besser.

Es wurde dann noch ein Versuch gemacht, die Wirkung des Insulins als Ersatz für den entfernten Hefestickstoff zu benutzen. Anstatt des erwarteten Ausgleichs trat eine Hemmung ein. Ähnliches ist auch beim Zusatz zu Ammonsalzen zu bemerken, wie die Tabelle mit Insulin zeigt. Die Steigerung durch Ammonacetat wird etwas gehemmt.

100 g leicht getrockneter Bierhefe, 400 g Zucker, 8000 g Wasser werden der einstündigen Gärung überlassen und auf zehn Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 1 g, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumcitrat, Flasche 4 erhält 1 g, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumbenzoat, Flasche 6 erhält 1 g, Flasche 7 erhält 2 g Ammoniumformiat, Flasche 8 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 9 erhält 2 g Ammoniumchlorid, Flasche 10 erhält 2 g Ammoniumphosphat. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	1 Citrat	2 Citrat	1 Benzoat	2 Benzoat	1 Formiat	2 Formiat	2 Oxalat	2 Chlorid	2 Phosphat
11h50 bis 12h15′	60	67	70	20	11	81	64	45	58	40
1 30 „ 38′	60	92	98	37	20	96	96	75	71	95
2 46 „ 54	60	88	90	46	28	90	98	85	80	105
3 46 „ 54	60	88	90	50	32	88	100	96	88	102

Bierhefe wurde nach längerem Waschen an der Luft getrocknet, dann in der oben beschriebenen Weise behandelt. Bei den ersten drei Salzen wurden zwei Konzentrationen angewandt. Beim Citrat tritt eine langsam ansteigende Erhöhung der Kohlensäureproduktion auf, die optimal durchschnittlich 60 Proz. erreicht. Beim Benzoat ist eine starke Hemmung zu verzeichnen, die auch bei der kleineren Dosis die Norm nach 5 Stunden nicht erreicht. Beim Formiat tritt bald eine Steigerung auf, die bei der kleineren Dosis schneller steigt, bei der größeren langsamer, dafür aber optimal 70 Proz. erreicht. Oxalat hemmt zu Beginn, steigert durchschnittlich erst um 35 Proz., später bis zu 60 Proz. Chlorid weist eine langsam steigende Erhöhung auf, die bis zu 60 Proz. geht. Phosphat steigert nach anfänglicher Hemmung optimal um 80 Proz.

Ergebnis. Citrat, Formiat, Oxalat, Phosphat steigern um 80 bis 100 Proz. Chlorid zeigt eine fortschreitende Steigerung bis 60 Proz., Benzoat hemmt stark.

100 g leicht getrockneter Bierhefe werden mit 200 ccm Wasser versetzt und nach einer halben Stunde durch feine Leinwand filtriert. Das Filtrat ist klar. Der feuchte Rückstand wird mit dem Tuch in 8000 ccm Wasser und 400 g Zucker gebracht, 1 Stunde der Gärung überlassen, dann auf 10 Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 1 g, Flasche 3 erhält 2 g Ammoniumcitrat, Flasche 4 erhält 1 g, Flasche 5 erhält 2 g Ammoniumbenzoat, Flasche 6 erhält 1 g Ammoniumformiat, Flasche 7 erhält 2 g davon, Flasche 8 erhält 2 g Ammoniumoxalat, Flasche 9 erhält 2 g Ammoniumchlorid, Flasche 10 erhält 2 g Ammoniumphosphat.

Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	1 Citrat	2 Citrat	1 Benzoat	2 Benzoat	1 Formiat	2 Formiat	2 Oxalat	2 Chlorid	2 Phosphat
11h50 bis 12h15′	40	54	53	16	11	43	40	12	28	5
1 30 „ 38′	44	76	84	40	25	91	90	58	46	53
2 46 „ 54	46	78	85	44	30	98	98	86	75	77
3 46 „ 54	55	80	86	52	38	100	108	95	82	85

Dieser Versuch ist mit dem vorigen gleichzeitig angestellt worden, es ist die gleiche Hefe, mit dem Unterschied, daß sie einmal gewaschen wurde. Die extrahierte Hefe wird mit b bezeichnet, die andere mit a. Kontrolle b arbeitet um 33 Proz. schlechter als Kontrolle a. Im Laufe des Versuchs tritt Erholung ein, aber erst nach 5 Stunden wird dieselbe Höhe wie bei a erreicht. Im Vergleich zur Kontrolle b arbeiten die Salze b genau wie bei a. Wird aber die erreichte Steigerung auf Kontrolle a bezogen, dann arbeiten sie mit Ausnahme des hemmenden Benzoats schlechter. Im Durchschnitt bleiben sie zu Beginn um 20 bis 40 Proz. zurück.

Ergebnis. Extrahierte Hefe bleibt in der Gärung anfänglich bis um 30 Proz. zurück. In ähnlicher Weise bleibt die Steigerung durch Ammonsalze zurück.

Versuch mit Insulin, Ammoniumacetat, Ammoniumphosphat.

100 g Hefe, 250 g Zucker, 6300 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 1 g Ammoniumacetat, Flasche 3 erhält 1 g Ammoniumphosphat, Flasche 4 erhält 0,5 g Ammoniumacetat + 0,5 g Ammoniumphosphat, Flasche 5 bis 7 erhalten je dasselbe + je 0,8 ccm Insulin = 16 Einheiten. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Acetat	Phosphat	Acetat + Phosphat	Acetat + Insulin	Phosphat + Insulin	Acetat + Phosphat + Insulin
12h14 bis 20′	45	82	78	58	80	110	100
12 43 „ 48	45	85	68	70	70	68	68
1 57 „ 2h02′	45	100	66	75	90	66	70
3 01 „ 08′	45	106	58	68	93	60	67

Ammoniumacetat in der Dosis von 1 g steigert die Wirkung der Gärung in der ersten Zeit um 90 Proz., Ammoniumphosphat um 55 Proz., 0,5 g Ammoniumacetat + -phosphat steigern zu Beginn weniger als die beiden ersten, erreichen aber schnell 55 Proz. Erhält Acetat Insulin, so wird die Wirkung des Acetats um 20 Proz. geringer, beim Phosphat zeigt das Insulin nur eine Steigerung zu Beginn, die bis 100 Proz. geht. Dasselbe findet sich bei der letzten Kolonne; diese arbeitet aber später um 10 Proz. weniger als die Flasche ohne Insulin.

Ergebnis. Insulin hemmt die Steigerung der Gärkraft durch Acetat, steigert die Triebkraft durch Phosphat um 100 Proz.

N-Bestimmung bei Wasser- und Zuckerhefe.

Von zwei Serien zu je sechs Flaschen erhalten die einen 800 g Wasser, die anderen 800 g 5proz. Zuckerlösung mit je 15 g Hefe. Jede Serie hat eine Kontrolle, die fünf anderen Flaschen erhalten jede eine anderes Ammonsalz in einer solchen Menge, daß in 20 ccm Gärflüssigkeit 5,8 mg N enthalten sind. Nach der Mischung und nach 5 Stunden wird ein Teil der Gärflüssigkeit zentrifugiert und in 20 ccm der N bestimmt. Die unten angegebenen Zahlen bedeuten mg N in 20 ccm. Temperatur 22°.

	Nach 10 Minuten		Nach 300 Minuten	
	Wasserhefe	Zuckerhefe	Wasserhefe	Zuckerhefe
1. Kontrolle	0,35	0,6	0,9	0,7
2. Chlorid	5,9	5,4	6,6	5,9
3. Sulfat	6,0	5,5	6,7	5,9
4. Carbonat	6,2	5,2	6,7	4,2
5. Acetat	6,0	5,3	6,5	3,7
6. Phosphat	6,2	5,1	6,1	3,8

Hefe mit Zucker scheidet schneller N aus; 5 Stunden später hat die Hefe ohne Zucker mehr N ausgeschieden. Wird zur Zuckerhefe Ammonsalz hinzugefügt, so verschwindet ein Teil sofort aus der Lösung. Bei Chlorid und Sulfat findet sich nach 5 Stunden bei der Wasser- und der Zuckerhefe mehr N. Die Zunahme bei der Wasserhefe entspricht ungefähr der Zunahme bei der Kontrolle. Zugenommen haben ebenfalls nach 5 Stunden Carbonat und Acetat bei der Wasserhefe, während Phosphat ungefähr ebensoviel N hat wie bei Beginn. Große Unterschiede zeigen sich bei Zuckerhefe mit Carbonat-, Acetat-, Phosphatzusatz. Hier hat die Gärflüssigkeit sehr viel N verloren.

Zur sicheren Erforschung des N-Stoffwechsels war es nötig, gleichzeitig Ammoniak- und Gesamt-N-Bestimmungen zu machen.

Ammoniak- und Stickstoffgehalt im Hefewasser.

Vier Flaschen erhalten je 20 g Hefe und 850 g Wasser. Flasche 1 erhält keinen Zusatz, Flasche 2 erhält 8 g Zucker, Flasche 3 erhält 1,86 g Ammoniumacetat mit 338,6 mg N, Flasche 4 erhält 1,86 g Ammoniumacetat + 8 g Zucker. Nach 15, 60 und 180 Minuten werden 120 ccm Hefewasser zentrifugiert, davon je 50 ccm zur Ammoniak- und Stickstoffbestimmung verwandt. Die Tabelle ergibt den N-Gehalt in 50 ccm. Der N-Gehalt des zugesetzten Ammoniumacetats in 50 ccm entspricht 19,9 mg.

Zeit:	Nach 15 Minuten			Nach 60 Minuten			Nach 180 Minuten		
N-Gehalt:	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N
1. Hefe	0,1	0,4	0,3	0,2	0,8	0,6	0,1	0,8	0,7
2. „ + Zucker	0,2	0,8	0,6	0,1	0,8	0,7	0,1	0,9	0,8
3. „ + 19,9 N	19,3	20,3	1,0	19,6	21,1	1,5	20,0	21,3	1,3
4. „ + 19,9 N + Zucker . . .	18,3	19,5	1,2	16,9	18,0	1,1	16,0	17,2	1,2

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß Zucker und Ammonsalz auf die N-Ausscheidung der Hefe beschleunigend und vermehrend wirken. Dazu wird ein Teil des zugefügten Ammoniaks sofort resorbiert; wenn Zucker vorhanden ist bedeutend mehr. Die Hefe 3 gibt ihren aufgenommenen Ammoniak N wieder ab, während die Hefe 4 fortgesetzt weiter aufnimmt.

Ergebnis. Die N-Ausscheidung der Hefe wird beschleunigt und vermehrt durch Zusatz von Zucker und Ammonsalz. Hefe ohne Zucker nimmt vorübergehend aus der Flüssigkeit Ammoniak auf, gibt es aber wieder ab. Hefe mit Zucker nimmt der Gärung entsprechend Ammoniak fortgesetzt auf.

Verteilung von Ammoniak-N und Rest-N in der Gärflüssigkeit.

50 g Hefe, 2800 g Wasser, 20 g Zucker werden nach 10 Minuten Umrühren auf vier Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 2,0 g Ammoniumchlorid mit 432 mg N, Flasche 3 erhält 2,4 g Ammoniumacetat mit 240 mg N, Flasche 4 erhält 2,4 g Ammoniumphosphat mit 249 mg N. Temperatur 20°. Gleich nach der Mischung werden je 30 ccm Flüssigkeit zentrifugiert und in je 10 ccm der Ammoniakgehalt durch Destillation mit Magnesiumoxyd und ebenfalls in je 10 ccm der Gesamtstickstoffgehalt nach *Kjeldahl* bestimmt. Nach 1 und 3 Stunden wird das Ganze wiederholt. Die Zahlen geben mg N in 10 ccm Flüssigkeit an. Die erste Zahl gibt die mg N, die zugesetzt wurden und sich in 10 ccm befinden.

Zeit:	Sofort				Nach 1 Stunde			Nach 3 Stunden		
N-Gehalt:	Zuges. N	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N
1. Normal . . .	—	0,2	0,7	0,5	0,1	0,8	0,7	0,1	0,7	0,6
2. Chlorid . . .	6,2	6,0	6,9	0,9	5,6	6,9	1,3	5,9	7,4	1,5
3. Acetat . . .	3,4	2,8	3,2	0,4	2,4	3,2	0,8	2,2	2,8	0,6
4. Phosphat . .	3,6	3,4	3,9	0,5	2,5	3,4	0,9	2,5	3,1	0,6
Gärkraft in der entsprechenden Zeit.										
Flasche 1 .			25			25			25	
„ 2 .			47			32			33	
„ 3 .			70			63			20	
„ 4 .			56			62			22	

Im Verlauf der Gärung verschwindet ein Teil des ausgeschiedenen NH_3. Aus zugesetztem Ammoniumchlorid wird ebenfalls NH_3 aufgenommen, doch wird es teilweise wieder frei. Auffallend ist der hohe Rest-N beim Chlorid. Vom Acetat wird fortgesetzt N aufgenommen, in 3 Stunden bis 35 Proz., ebenfalls vom Phosphat bis 30 Proz. Der Rest-N der beiden letzten Flaschen unterscheidet sich vom Rest-N der Norm nicht viel. Die ebenfalls angegebene Gärkraft weist auf einen Zusammenhang mit dem Stickstoffumsatz: Die Steigerung durch Ammonphosphat und -acetat steht in Beziehung zum aufgenommenen Ammoniak, die Steigerung durch Ammonchlorid steht in Beziehung zum Rest-N.

Permeabilität von Ammonsalzen für Bierhefe.

Je 30 g Bierhefe werden mit je 500 ccm Wasser zu einer feinen Aufschwemmung verrührt, im ganzen werden sechs Flaschen genommen. Flasche 1 wird Kontrolle, die übrigen Flaschen erhalten so viel Ammonsalz, daß in je 50 ccm 5,5 n/10 NH_3 enthalten ist, Flasche 2 erhält Ammoniumbenzoat, Flasche 3 erhält Citrat, Flasche 4 erhält Formiat, Flasche 5 erhält Jodid, Flasche 6 erhält Phosphat. Nach 10 Minuten und nach 3 Stunden werden je 120 ccm zentrifugiert, 50 ccm dienen zur Bestimmung des Ammoniaks und 50 ccm zur Bestimmung des Gesamt-N.

	Nach 10 Minuten			Nach 3 Stunden		
	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N
Flasche 1 normal	0,00	0,45	0,45	0,1	0,55	0,45
„ 2 Benzoat	5,05	5,4	0,35	4,9	5,5	0,6
„ 3 Citrat	4,9	5,6	0,7	4,95	5,65	0,7
„ 4 Formiat	4,65	5,7	1,05	5,2	6,05	0,85
„ 5 Jodid	5,55	5,9	0,35	5,35	6,15	0,8
„ 6 Phosphat . . .	5,6	6,2	0,6	5,7	6,3	0,6

Die Hefe scheidet nach kurzer Zeit 0,45 n/10 N aus, nach 3 Stunden 0,55. Bei der ersten Portion ließ sich durch Magnesiumoxyd kein Ammoniak überdestillieren, während in der zweiten 0,1 als NH_3 enthalten war. Beim Zusatz der Ammonsalze ist es auffällig, wie schnell ein Teil des Ammons in die Zellen geht. Jede Flasche hat 5,5 n/10 NH_3 bekommen; nur das Jodid weist denselben Betrag auf. Formiat und Phosphat haben 0,85 bzw. 0,9 abgegeben, während das Benzoat und das Citrat ungefähr die Hälfte davon abgegeben haben. Anders verhält es sich mit dem von der Hefe abgegebenen N. Benzoat und Jodid weisen etwas weniger auf als die Norm. Citrat und Phosphat haben beinahe das Doppelte der vorigen Salze, während Formiat das Dreifache aufweist. Nach 3 Stunden sind die Zahlen etwas anders. Das Ammoniak von Benzoat, Citrat und Phosphat ist ungefähr dasselbe geblieben, Jodid hat etwas abgenommen, Formiat zu. Auch der Rest-N hat sich geändert, die großen Differenzen haben sich ausgeglichen, doch enthalten alle Ammonflaschen mehr Rest-N als die normale.

Permeabilität von Ammonsalzen für Bierhefe bei Zucker.

Für sechs Flaschen werden je 30 g Bierhefe in 500 g 5proz. Zuckerlösung verrührt. Flasche 1 wird Kontrolle, die übrigen Flaschen erhalten so viel Ammonsalz, daß in 50 ccm Gärflüssigkeit 5,5 n/10 NH_3 enthalten ist. Flasche 2 erhält Ammoniumbenzoat, Flasche 3 erhält Citrat, Flasche 4 erhält Formiat, Flasche 5 erhält Jodid, Flasche 6 erhält Phosphat. Nach 10 Minuten, nach 1 Stunde, nach 14 Stunden werden je 120 ccm zentrifugiert, 50 ccm dienen zur Bestimmung des Ammoniaks, 50 ccm zur Bestimmung des Gesamt-N.

Zeit:	Nach 10 Minuten			Nach 1 Stunde			Nach 14 Stunden		
Normal:	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N
Normal	0,15	0,6	0,45	0,10	0,40	0,3	0,1	0,7	0,6
Benzoat	4,35	6,0	1,65	4,9	5,85	0,95	4,95	5,9	0,95
Citrat	5,65	7,2	1,55	3,85	4,40	0,55	1,25	2,0	0,75
Formiat	3,3	4,3	1,0	3,1	3,35	0,25	0,8	1,5	0,7
Jodid	5,3	5,9	0,6	5,1	5,9	0,8	2,4	3,5	1,1
Phosphat	4,7	5,3	0,6	3,15	3,3	0,15	1,4	2,4	1,0

Die Kontrolle weist sofort mehr Rest-N auf, als die vorige ohne Zucker, dazu zeigt sich Ammoniak. Im Laufe der Gärung nimmt das Ammoniak etwas ab, auch der Rest-N, der dann am Ende der Gärung wieder zunimmt. Das schnelle Verschwinden mancher Ammonsalze aus der Gärflüssigkeit ist hier noch auffälliger als bei dem früheren Versuch. Am eigenartigsten verhält sich das Citrat, das im Grunde beim vorigen Versuch abnahm, hier aber zunimmt. Hier wird es sicher nicht resorbiert, und die Zunahme erklärt sich aus dem Zukommen des Ammoniaks der Hefe. Das Formiat dagegen hat sehr viel Ammon verloren. Der Rest-N hat sich bei Benzoat und Citrat aufs Vierfache erhöht, bei den anderen etwas weniger, nur das Phosphat zeigt keine Zunahme seines Rest-N. Nach einer Stunde weisen Formiat und Phosphat den gleichen Stand des Ammon-N auf, daran anschließend kommt Citrat, während das Benzoat und das Jodid noch einen hohen Stand des NH_3 aufweisen. Beim Benzoat zeigt sich sogar eine Zunahme. Der Rest-N zeigt beim Formiat und Phosphat eine Abnahme, ebenfalls beim Benzoat und Citrat. Beim letzten Versuch ist ein großer Teil des Ammoniaks

verschwunden, am meisten beim Formiat. Seinen NH_3 hat das Benzoat behalten. Auch der Rest-N zeigt ungefähr einen gleichen Stand, ist aber höher als der Rest-N beim normalen.

Ammoniak- und Stickstoffgehalt der Gärflüssigkeit von Preßhefe nach Zusatz von Ammonsalzen.

Sechs Flaschen erhalten je 15 g Hefe in 500 g Wasser. Die erste Flasche wird Kontrolle, die nächsten erhalten von verschiedenen Ammonsalzen so viel, daß in 50 ccm Gärflüssigkeit 11,0 n/10 NH_3 enthalten ist. Nach 10 Minuten und 180 Minuten werden je 120 ccm zentrifugiert und davon je 50 ccm zur NH_3- und Gesamt-N-Bestimmung verwandt. Die angegebenen Zahlen bedeuten n/10 Lösung.

Zeit:	Nach 10 Minuten			Nach 180 Minuten		
N-Art:	NH_3	Ges.-N	Rest-N	NH_3	Ges.-N	Rest-N
1. Kontrolle	0,1	0,35	0,25	0,2	0,65	0,45
2. Carbonat	11,05	11,40	0,35	10,2	11,0	0,8
3. Acetat	11,1	11,5	0,4	10,3	11,0	0,7
4. Phosphat	11,0	11,45	0,45	10,8	11,5	0,7
5. Chlorid	11,0	11,3	0,3	10,8	11,7	0,9
6. Sulfat	11,2	11,5	0,3	11,0	11,65	0,65
Dieselbe Bestimmung mit 1proz. Zuckerlösung.						
1. Kontrolle	0,2	0,6	0,4	0,1	0,6	0,5
2. Carbonat	10,1	10,75	0,65	8,4	8,8	0,4
3. Acetat	10,0	10,7	0,7	8,5	8,8	0,3
4. Phosphat	10,5	11,3	0,8	8,7	9,2	0,5
5. Chlorid	10,8	11,45	0,65	9,6	9,95	0,35
6. Sulfat	11,0	11,5	0,7	9,5	9,9	0,4

Ohne Zuckerzusatz dringen in stärkerem Maße Carbonat und Acetat in die Zelle ein; Phosphat, Chlorid, Sulfat dringen kaum ein. Deutlich ist die Vermehrung des Rest-N durch Ammonsalze zu sehen.

Mit Zuckerzusatz ändern sich die Verhältnisse. Carbonat, Acetat dringen sofort ein, auch Phosphat beginnt einzudringen; Chlorid und Sulfat zeigen eine geringe Abnahme. Es bietet sich ein ähnliches Bild, wie bei der ersten Tabelle nach 180 Minuten. Bei der Zuckerhefe haben sich die Verhältnisse zu dieser Zeit ganz verschoben: Carbonat, Acetat, Phosphat haben über 20 Proz. ihres Ammonstickstoffs an die Zelle abgegeben, Chlorid und Sulfat aber nur 12 Proz. Phosphat wird von der Zelle ohne Zucker geringfügig aufgenommen, dagegen mit Zucker genau wie Acetat und Carbonat. Außerdem ergibt sich, daß bei Zuckerzusatz alle Ammonsalze relativ besser von der Zelle aufgenommen werden.

Es wird bestätigt, daß die Hefe N nach außen abgibt. Dieser N wird schneller und vermehrt abgegeben bei Zusatz von Zucker, Ammonsalzen und höherer Temperatur. Dazu wurde die Abscheidung einer kleinen Menge Ammoniaks beobachtet. Ebenfalls wurde bestätigt, daß nach Wegnahme dieses N die Gärung langsamer einsetzt. Dieser N steht anscheinend im Zusammenhang mit dem Eintritt der Gärung; die Triebkraft der Hefe ist der Ausdruck seiner Wirkung. Um vorläufig eine Vorstellung der Wirkung

zu haben, nehme ich an, daß die Hefe durch Berührung mit Flüssigkeit zur Ausscheidung des N angeregt wird. Die oben erwähnten Substanzen und die Temperatur können den Vorgang beschleunigen und vermehren. Es lag nahe, das mitausgeschiedene Ammoniak in Beziehung zur Ursache der Steigerung durch Ammonsalze zu bringen. Das hat sich nicht bestätigt. Spuren von Ammonsalzen wirken kaum, nur Konzentrationen von mindestens 1 Prom. bringen die hohe Steigerung hervor. Außerdem tritt im Verlauf der Gärung eine feste Bindung des ausgeschiedenen NH_3 auf, sobald Zucker zugefügt wird. Es ist auch merkwürdig, daß die Steigerung durch Ammonsalze bei höherer Temperatur kleiner wird und bei niederer Temperatur größer. Dies spricht für einen besonderen Ablauf dieser Steigerung. Die 100 Proz. steigernden Ammonsalze dringen, ausgenommen das Phosphat, auch ohne Zucker in die Zelle. Dies spricht dafür, daß nicht die Aufnahme der Ammonsalze durch die Zelle es ist, die die Steigerung bewirkt — dann wäre die Steigerung durch Phosphat nicht zu verstehen —, sondern es dringt in die Zelle eine komplexe Verbindung ein, durch die es auch den Phosphaten möglich ist, in die Zelle einzudringen.

Im Laufe der Gärung kommt sicher nicht mehr verwendbarer Stickstoff zur Ausscheidung, was mit den Anschauungen und Befunden *Mayers* und *Rubners* übereinstimmt. Für die Richtigkeit meiner Gedankengänge spricht *Mayers* Ergebnis, daß frisches Hefewasser die Gärung fördert und Hefewasser, in dem eine Gärung stattgefunden hat, die Gärung hemmt.

Versuch mit Lebedewsaft.

Zu je 10 ccm Saft kommen 4 g Zucker. Dazu erhält Flasche 2 50 mg Ammoniumchlorid, Flasche 3 50 mg Ammoniumbenzoat, Flasche 4 50 mg Ammoniumoxalat, Flasche 5 50 mg Ammoniumphosphat, Flasche 6 50 mg Ammoniumformiat, Flasche 7 50 mg Kaliumphosphat. Saft und Lösung werden auf eine Wasserstoffionen-Konzentration von $p_H = 6{,}4$ eingestellt. Temperatur 20°.

Zeit	Kontrolle	Chlorid	Benzoat	Oxalat	Phosphat	Formiat	K-Phosphat
Nach 1 Stde.	13	13	12	7	15	12	14
„ 5 Stdn.	29	26	27	11	34	26	32
„ 12 „	50	44	45	16	60	46	55

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Ammonsalze keine Steigerung der Saftwirkung hervorrufen; das Oxalat hemmt stark, es entwickelt nur den dritten Teil der Leistung von der Norm. Der Saft zeigt eine deutliche Trübung, die von einer Kalkfällung herrührt. Das Ammoniumphosphat und das Kaliumphosphat, die durch entsprechende Mischung ihrer primären und sekundären Salze auf die entsprechende p_H-Konzentration gebracht wurden, rufen eine Steigerung um 20 bzw. 10 Proz. hervor. Beim Versuch mit kleineren Dosen Ammonsalz bleibt die Wirkung dieselbe. Nur ist die Hemmung, die bei den Ammonsalzen nach einiger Zeit eintritt, bei den kleineren Dosen nicht vorhanden.

Ergebnis. Ammonsalze rufen beim Lebedewsaft keine Steigerung hervor, abgesehen von dem phosphorsauren Salz. Das oxalsaure Salz wirkt schädigend durch Fällung der Calciumionen.

Versuch mit Lebedewsaft.

Jede Flasche erhält 10 ccm Saft, dazu kommen je 4 g Zucker. Außerdem erhält Flasche 2 50 mg Ammoniumchlorid, Flasche 3 50 mg Ammoniumbenzoat, Flasche 4 50 mg Ammoniumoxalat, Flasche 5 50 mg Ammoniumphosphat, Flasche 6 50 mg Ammoniumformiat, Flasche 7 50 mg Kaliumphosphat. Saft und Lösung werden auf eine Wasserstoffkonzentration von $p_H = 6{,}0$ eingestellt. Temperatur 20°. Die Ablesung geschah, sobald die Norm weitere 5 ccm erreicht hatte.

Kontrolle	Chlorid	Benzoat	Oxalat	Phosphat	Formiat	K-Phosphat
5	6	6	2	10	5	9
25	25	24	2	50	23	48
50	44	45	2	82	41	71

Auch hier zeigt sich beim Zusatz von Ammonsalzen keine Steigerung, höchstens beim Chlorid und Benzoat zu Beginn eine kleine, die aber wie beim Formiat bald in eine Hemmung von ungefähr 10 bis 15 Proz. übergeht. Das Oxalat zerstört die Saftwirkung vollkommen. Dagegen steigern Ammonium- und Kaliumphosphat wie im vorigen Versuch, nur bedeutend höher, bis 100 Proz. zu Beginn. Der Unterschied zum vorigen Versuch beruht zum Teil auf einer geringen Änderung der p_H (6,4 und 6,0); ich habe aber auch festgestellt, daß es nicht möglich ist, einen vollkommen gleichwirkenden Saft zu verschiedenen Zeiten zu bekommen.

Ergebnis. Ammonsalze sind ohne steigernde Wirkung auf Lebedewsaft, ausgenommen das phosphorsaure Salz. Das oxalsaure Salz löst eine vollständige Hemmung aus.

Beim Rückblick ist folgendes festzustellen:

1. Der Lebedewsaft wird durch Zusatz von Ammonsalzen, abgesehen von den Phosphaten, in seiner Wirkung nicht gesteigert. Mit Buchnerpreßsaft zu arbeiten, war aus äußeren Gründen nicht möglich, doch wird der Lebedewsaft bevorzugt wegen des Fehlens von Selbstgärung. In beiden Säften sind für meine Untersuchungen die Eiweißspaltprodukte hinderlich, da sie eine Wirkung der zugesetzten Ammonsalze überdecken können. Derselbe Einwand trifft auch für die Phosphate zu, die aber trotzdem wirksam sind. Kleinere oder größere Dosen von Ammonsalzen ergaben das gleiche Resultat wie bei den angeführten Versuchen. So ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Ammonsalze auf die Zymase ohne Wirkung sind.

2. Die Ammonsalze dringen verschieden schnell in die Zelle ein. In geringem Grade dringen ein: Chlorid, Sulfat, Phosphat, Bromid, Jodid usw., in stärkerem Maße: Acetat, Carbonat, Oxalat, Formiat usw. Diese Zusammenstellung entspricht ungefähr der *Grijns*schen für die Permeabilität der Erythrocyten, wenn nach *Höber* berücksichtigt wird, daß Ammonchlorid nur eindringt, wenn freies Ammoniak vorhanden ist. Bei den Salzen, die nur in geringem Grade eindringen, wird es sich wahrscheinlich um eine Adsorption der Oberfläche handeln. Durch dieses geringe Eindringen wird die Triebkraft gesteigert, wahrscheinlich auch die 25proz. Steigerung der Gärkraft hervorgerufen. Wird Zucker zugesetzt, so dringt viel mehr Ammonsalz in die Zelle; auch Ammoniumphosphat wird in gleicher Weise wie Ammoncarbonat aufgenommen. Dies spricht dafür, daß nicht das Eindringen der Ammonsalze allein die Ursache für die Steigerung um

100 Proz. ist, sondern das Eindringen mit Zucker gemeinsam, entweder als Ester- oder als komplexe Verbindung. Auch der optimale Eintritt der Steigerung bei nur hohen NH_3-Dosen spricht dafür.

3. Es wird festgestellt, daß durch Salzmischungen, bei denen die Möglichkeit besteht, daß sich ein 100 Proz. steigerndes Ammonsalz bildet, dasselbe Resultat erreicht wird wie mit dem reinen Salz, die gleiche Konzentration vorausgesetzt. Eine Ausnahme bildet eine Mischung mit Phosphat und Formiat, die eine Senkung der Steigerung verursacht, während sonst ein kleiner Zusatz von Phosphat zum Ammonsalz eine weitere Steigerung bewirkt.

4. Bierhefe zeigt in bezug auf die Steigerung der Gärtätigkeit durch Ammonsalze im Vergleich mit der Preßhefe verschiedene Unterschiede.

Ergebnis.

Die Gärkraft der Preßhefe wird gesteigert um 80 bis 140 Proz. durch Ammoniumphosphat, -carbonat, -oxalat, -citrat, -tartrat, -formiat; um 20 bis 30 Proz. durch Ammoniumchlorid, -sulfat, -bromid, -jodid, -nitrat, -magnesiumsulfat, -benzoat, -molybdat, -rhodanid.

Die Gärkraft der Bierhefe wird durch dieselben Salze gesteigert mit folgenden Ausnahmen: Ammoniumbenzoat hemmt stark die Gärung, und Ammoniumcitrat, das nur in schwachen Dosen auf die Preßhefe steigernd und in etwas höheren giftig wirkt, steigert die Gärtätigkeit der Bierhefe auch in stärkeren Dosen.

Die Stickstoffausscheidung der Hefe steht im Einklang mit der Triebkraft.

Die Permeabilität der Ammonsalze ist ungefähr proportional zu der Steigerung der Gärkraft, ausgenommen Ammoniumphosphat, das eine geringe Permeabilität aufweist bei einer hohen Steigerung der Gärkraft. Versuche ergeben, daß die Steigerung wahrscheinlich mit einer Komplexbindung von Zucker und Ammonsalzen zusammenhängt.

Ammonsalze steigern die Wirkung von Lebedewsaft nicht.

Insulin ersetzt die Cofermentwirkung nicht, hemmt außerdem teilweise die Steigerung durch Ammonsalze.

Literatur.

Boas, diese Zeitschr. **117**, 166, 1921. — *Effront*, C. r. **117**, 559; **118**, 1420. — *Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**, 122. — *Grijns*, Pflügers Arch. **63**, 86, 1896. — *Höber*, Physik. Chem., Leipzig 1911. — *Ad. Mayer*, Gärungschemie, Heidelberg 1902. — *Neuberg*, diese Zeitschr. **83**, 252, 1917. — *Paine*, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **84**, 289, 1912. — *Palladin* und *Iwanoff*, diese Zeitschr. **42**, 325, 1921. — *Pringsheim*, ebendaselbst **3**, 145, 1907. — *Rubner*, Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung, Leipzig 1913. — *Thénard*, Ann. d. Chim. **46**, 294, 1803 nach *Iwanoff*. — *Maclean*, Biochem. Journ. **18**, 1273, 1924.

Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur.

X. Mitteilung:

Beitrag zur Geochemie des Jods.

Von

Th. von Fellenberg und **Gulbrand Lunde.**

(Aus dem Laboratorium des eidgenössischen Gesundheitsamtes in Bern.)

(Eingegangen am 7. Juni 1926.)

Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. *V. M. Goldschmidt* in Oslo unternommen.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. *Goldschmidt* auch an dieser Stelle für seine wertvolle Beratung bei der zweckmäßigen Auswahl der zu untersuchenden Gesteine und Mineralien zu danken.

Die untersuchten Materialien stammen zum Teil aus der Sammlung des mineralogisch-geologischen Museums (Prof. *J. Schetelig*), zum Teil aus der Sammlung des mineralogischen Instituts der Universität Oslo (Prof. *V. M. Goldschmidt*). Wir sprechen den beiden Herren für ihr freundliches Entgegenkommen unseren besten Dank aus.

Bei der großen Bedeutung, welche die Verteilung des Jods auf der Erdoberfläche für das pflanzliche und tierische Leben hat, ist es auch für die Biochemie des Jods von Wichtigkeit, daß die geochemischen Grundlagen dieses Elements erforscht werden.

V. M. Goldschmidt[1]) rechnet das Jod zwar unter Zweifel vorläufig zu den lithophilen Elementen, hebt aber hervor, daß es bei der ersten Phasenteilung des Erdballs vielleicht größtenteils in der Dampfhülle angesammelt und dann mit dem Wasserdampf in der ältesten Hydrosphäre kondensiert wurde. Es müßten dann die Sedimentgesteine reicher an Jod im Verhältnis zu Chlor sein als die Eruptivgesteine.

Es war Herrn Prof. *Goldschmidt* daran gelegen, daß an einigen einwandfrei erhobenen Gesteinsproben nachgewiesen werde, ob Jod überhaupt in den Eruptivgesteinen vorkomme, ob also der lithophile

[1]) *V. M. Goldschmidt*, Geochemische Verteilungsgesetze der Elemente II, Vid. Selsk. Skr. I Oslo 1924, Nr. 4.

Charakter des Jods als vollkommen sichergestellt betrachtet werden könne.

Es handelt sich hier für den einen von uns *(Th. von Fellenberg)* um eine Nachprüfung seiner eigenen Resultate; denn er hatte[1]) bereits vor zwei Jahren in Bestätigung der früheren Resultate von *A. Gautier*[2]) in Urgesteinen regelmäßig Jod gefunden. Es konnte aber bei jenen Untersuchungen der Einwand gemacht werden, daß die Proben nicht einwandfrei von fachmännischer Seite erhoben worden waren. Sie wurden, wie damals erwähnt worden ist, auf einer Bergtour entweder im Geröll zusammengelesen oder an der Oberfläche des anstehenden Felsens abgeschlagen. Hier wäre also immerhin die Möglichkeit vorhanden gewesen, daß das Jod von außen eingewandert wäre. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Proben waren in dieser Beziehung einwandfrei. Aus dem Innern von Gesteinsblöcken von 5 bis 10 kg Gewicht wurden Stücke von ungefähr 1 kg herausgehauen und diese von Norwegen nach Bern transportiert. Hier wurden unmittelbar vor der Untersuchung die äußeren Partien abgeschlagen und nur das Innere verwendet. Der untersuchte Basalt wurde im Gegensatz zu den anderen Gesteinen aus einem gewöhnlichen Handstück herausgeschlagen. Auch bei den Mineralien entfernten wir stets die äußeren Schichten. Es handelt sich in allen Fällen um große, einwandfreie Stufen.

Die Frage, ob die Sedimentgesteine im Verhältnis zu Chlor jodreicher seien als die Urgesteine, wurde durch diese früheren Untersuchungen nicht direkt berührt, da keine Chlorbestimmungen ausgeführt worden waren; hingegen hatte man im allgemeinen bei den Sedimenten eher höhere, oft sogar sehr hohe Jodgehalte gefunden.

Von Interesse war es zu erforschen, ob das im Urmagma vorhandene Jod, dessen Existenz wir auch hier wieder mit völliger Sicherheit feststellen konnten, bei der Differentiation in speziellen Mineralien angereichert werde. Man würde dabei zunächst an die halogenhaltigen Mineralien denken.

Aus der oben erwähnten Arbeit *Th. von Fellenbergs* (l. c. S. 160) geht hervor, daß die halogenhaltigen Mineralien sich nicht durchweg durch hohen Jodgehalt auszeichnen, obwohl ziemlich hohe Gehalte bei ihnen angetroffen werden. Es scheinen vielmehr andere Faktoren für die Menge des Jods bestimmend zu sein. So erwiesen sich Kupfermineralien, und zwar von verschiedenen Vorkommen, mehrfach als sehr jodreich; auch einige Bleimineralien (Pyromorphit, Wulfenit) wiesen große Jodgehalte auf.

Um zu sehen, wie sich die Jodmengen auf die verschiedenen Mineralien ein und desselben Vorkommens verteilen, wurden aus den

[1]) Diese Zeitschr. 152, 153, 1924.
[2]) C. r. 132, 935.

Pegmatiten von Halvorsröd, Raade in Östfold Mikroklinperthit, Albit, Muskovit, Rauchquarz und Flußspat untersucht.

Bei der Untersuchung ging man im Prinzip gleich vor, wie bei den früheren Untersuchungen von Gesteinen und Mineralien[1]). Man wandte aber möglichst weitgehende Vorsichtsmaßregeln an. Zwei Fehlerquellen mußten tunlichst ausgeschaltet werden. Man durfte nicht Jod finden, welches nicht wirklich in den Gesteinen war, sondern aus den Reagenzien stammte; man mußte sich aber auch vergewissern, daß möglichst alles wirklich vorhandene Jod isoliert wurde. Man unterzog daher die Methode einer erneuten Prüfung.

Die erstere Fehlerquelle war in unserem Falle die bedenklichere. Bei der Analyse der Gesteine muß im Gegensatz zur Jodbestimmung in organischen Materialien mit verhältnismäßig sehr großen Mengen Reagenzien gearbeitet werden. Ein kleiner Jodgehalt in den Reagenzien, der in anderen Fällen noch eher hingenommen werden darf, kann hier schon recht verhängnisvoll werden. Da absolute Jodfreiheit nicht in allen Fällen zu erreichen ist, mußte man den Jodgehalt der so gut wie möglich gereinigten Reagenzien jedesmal in Rechnung ziehen.

Das Prinzip der Methode besteht bei Carbonatgesteinen darin, daß man das Gestein in Salzsäure löst, den Kalk mit Kaliumcarbonat ausfällt, das Jod mit Alkohol extrahiert und nach geeigneter Isolierung kolorimetrisch, bei größeren Mengen auch titrimetrisch bestimmt.

Silikate werden mit Kaliumhydroxyd aufgeschlossen; die Schmelze wird in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und weiter verarbeitet wie die Carbonate.

Die *Reinigung der Reagenzien* geschah folgendermaßen:

Kalilauge. Bereits einige Monate vor Inangriffnahme dieser Untersuchungen hatte der eine von uns *(Th. von Fellenberg)* fünf verschiedene Handelssorten von Kaliumhydroxyd auf Jod untersucht und folgende Mengen gefunden:

	γ J im kg
Kalium hydricum depuratum *Merck*	108
Kalium hydricum purum *Merck*	24
Kalium hydricum in Stangen, *Kahlbaum* . . .	28
Pottasse caustique pur *de Haen*	50
Kaliumhydroxyd techn. in Stücken, *Griesheim* .	27

Wir geben die Jodgehalte als γ (Gamma) = 0,001 mg an.

Da das technische Kaliumhydroxyd ungefähr gleich jodarm war wie die jodärmsten reinen Produkte, wurde damit eine weitere Reinigung vorgenommen. Man kristallisierte das Produkt aus Wasser um, filtrierte die Kristalle nach vollständigem Erkalten durch eine Nutsche (ohne Filtermaterial) und saugte so gut wie möglich ab. Leider halten die Kristalle

[1]) *Th. von Fellenberg*, diese Zeitschr. **152**, 116, 1924.

sehr viel Mutterlauge zurück. Da sie nicht fest aufeinanderliegen, wirkt das Absaugen nur recht mangelhaft.

Die Kristalle wurden in Wasser gelöst zu einer nahezu gesättigten Lauge. Sie enthielt pro Kubikzentimeter 0,68 g KOH; darin waren 0,008 γ Jod vorhanden oder pro Gramm 0,012 γ.

Die ersten unserer Analysen wurden mit dieser Lauge gemacht. Dann dachten wir aber daran, neben dem Jod auch das Brom in den Gesteinen zu bestimmen. Da die Reinigung der Reagenzien von Brom noch schwieriger ist als von Jod, verzichteten wir im weiteren auf die aus rohem KOH bereitete Lauge und stellten eine neue her aus Kalium hydricum purum *Merck*, und zwar aus einer nicht vorher analysierten Probe.

1 kg KOH wurde in einer Silberschale (auch Eisenschalen können verwendet werden) in 0,5 Liter Wasser gelöst, die Lösung abgekühlt und nach einigen Stunden filtriert. Die Kristalle wurden in wenig heißem Wasser gelöst und nochmals auskristallisieren gelassen. Man saugte den Kristallbrei nochmals auf der Nutsche ab und wusch ihn mit 1 Liter Äther, um die zwischen den Kristallen sitzende Mutterlauge möglichst herauszuschwemmen. Aus den Kristallen wurde eine konzentrierte wässerige Lösung bereitet, und zwar erhielt man von 1 kg Ausgangsmaterial 600 ccm Lauge. Der Jodgehalt war trotz dem zweitmaligen Umkristallisieren und dem Auswaschen nicht niedriger, sondern genau gleich, wie bei der einmal umkristallisierten rohen KOH. Vermutlich war das Ausgangsmaterial diesmal jodreicher gewesen.

Salzsäure. Unsere nicht von Jod befreite, reine Salzsäure enthielt in der Verdünnung 1 : 1 0,012 γ pro ccm. Das ist ein recht hoher Gehalt. Öfters ist die Salzsäure so gut wie jodfrei. Die Reinigung nahmen wir vor durch sorgfältige Destillation von 500 ccm konzentrierter Säure aus einer 2 Liter fassenden Glasretorte unter Zusatz von etwas Chlorwasser. Das Destillat wurde unter guter Kühlung in demselben Volumen Wasser aufgefangen und zum Schluß mit 2 g Natriumbisulfit versetzt. Das zugesetzte Chlor oxydiert die vorhandene Jodwasserstoffsäure zu Jodsäure und diese bleibt im Rückstand.

Kaliumcarbonat. Der eine von uns *(Th. von Fellenberg)* hatte schon öfters beobachtet, daß die früher angegebene Reinigung der Pottasche mit Alkohol bei etwas hohem ursprünglichen Jodgehalt nicht immer gut zum Ziele führt. Es könnte sein, daß das Jod gelegentlich nicht als Jodid, sondern als in Alkohol schwerer lösliches Jodat vorliegt. Auch zweimaliges Umkristallisieren und gründliches Auswaschen der Kristalle auf der Nutsche führte merkwürdigerweise nicht zum gewünschten Ziele. Dies wurde aber erreicht durch eine Reinigung mit Silbernitrat.

Aus 1 kg reinem Kaliumcarbonat wird eine gesättigte wässerige Lösung bereitet und diese nach dem Filtrieren mit 30 ccm n/10 $AgNO_3$-Lösung versetzt. Man schüttelt kräftig, kocht auf und kühlt ab. Die Lösung ist durch kolloidale Silberverbindungen getrübt. Sie wird durch ein Kollodiumfilter ultrafiltriert. Es dürfte vielleicht auch genügen, die Lösung statt der Ultrafiltration 1 bis 2 Wochen stehenzulassen und sie dann abzuheben. Die so bereitete Lösung enthielt 0,0025 γ Jod im Kubikzentimeter. Da sie nitrathaltig ist, benutzten wir sie nur bei den ersten Operationen, wo große Carbonatmengen verwendet werden, bei der Neutralisation der sauren Lösungen und zur Abscheidung des Salzbreies. Bei den letzten Alkoholextraktionen, bei denen nur einige Tropfen der Lösung benötigt werden, arbeiteten wir hingegen mit einer nach dem früher angegebenen Verfahren gereinigten Pottaschelösung.

Die Frage, ob das vorhandene Jod bei unserem Analysengang vollständig zur Bestimmung gelangt, suchten wir auf mehrfache Art zu entscheiden. Es schien gut möglich, daß bei der Kalischmelze ein Teil des Jods verlorengeht. Alkalijodid ist nach der Literatur bei Rotglut flüchtig. Bei der Schmelze wird die untere Grenze der Rotglut eben erreicht.

Man führte einige Jodbestimmungen an je 2 g Granit unter Zusatz von Kaliumjodid aus. Unser Granit enthielt 0,4 γ Jod in 2 g. Die zugesetzten Mengen betrugen 1, 2,5 und 5 γ Jod. Man fand in allen Fällen nur ungefähr die Hälfte des zugesetzten Jods.

Es wäre nun voreilig, daraus den Schluß zu ziehen, daß auch bei unseren Bestimmungen überall die Hälfte verlorengegangen sei; denn es könnte gut sein, daß das Jod in den Gesteinen erst gegen Schluß der Erhitzung abgespalten wird. Dann ist es nur ganz kurze Zeit der Einwirkung der hohen Temperatur ausgesetzt; zudem ist es dann in einer dickflüssigen, beinahe festen Schmelze drinnen, welche ein Entweichen viel weniger leicht gestattet, als dies beim Eindampfen der verdünnteren Lauge nach dem Versetzen mit Kaliumjodid der Fall ist.

Wir unternahmen nun folgenden Versuch: Wir gingen von einem jodreichen Sedimentgestein aus, einem Kalkfelsen vom Nordufer des Bielersees, wahrscheinlich Neocom. Darin bestimmten wir das Jod auf die bei den Carbonatgesteinen übliche Weise nach dem Auflösen in Salzsäure (s. oben). Hier war also die Kalischmelze vermieden.

Man fand in 2 g Material titrimetrisch bestimmt 11,2 γ Jod.

Nun führten wir die Bestimmung mit demselben fein gepulverten Material durch Aufschließen mit Kalilauge aus. Man erhitzte so lange, bis die Schmelze erstarrte und der Boden des Tiegels in leichte Rotglut kam. Das Schmelzen dauerte eher länger als bei dem Aufschließen der Silikate. Die Schmelze wurde in Wasser gelöst und das Jod einerseits in der wässerigen Lösung, andererseits im unlöslichen Anteil, also im Kalk, nach Auflösen in Salzsäure bestimmt. Man fand:

	1.	2.
In der Lösung	10,3 γ	11,0 γ
Im Kalkrückstand	1,0	0,3
Summe	11,3 γ	11,3 γ

Differenz + 0,1 γ

Die Werte nach der Kalischmelze stimmen mit demjenigen der direkten Bestimmung ausgezeichnet überein. Somit ist durch das Aufschließen kein Jod verlorengegangen. Der Versuch ist auch in anderer Richtung wertvoll. Er zeigt uns, daß auch aus Carbonaten, wo eine chemische Umwandlung durch das Erhitzen mit K O H theoretisch kaum vorauszusehen ist — höchstens vielleicht eine geringe Kohlen-

dioxydabspaltung —, trotzdem das Jod an die Schmelze abgegeben wird. Ausschließlich um eine Wärmewirkung scheint es sich nicht zu handeln, obschon eine solche sicher mitspielt; denn durch Erhitzen auf schwache Rotglut in einem Quarzrohr konnte man nur ein Fünftel des Jods abspalten, d. h. in alkohollösliche Form überführen.

Es war nun noch denkbar, daß das schlechte Resultat bei den Kaliumjodidzusätzen daher rührte, daß nicht beim Schmelzen Jod verlorenging, sondern daß solches bei dem späteren Ausziehen der zersetzten Silikatschmelze mit Alkohol durch Adsorption zurückgehalten wurde. Dieser Fehler wäre natürlich bei dem vorliegenden Versuch ausgeschaltet. Wenn dies der Fall war, so mußte ein ungünstigeres Resultat erhalten werden beim Aufschließen einer Mischung unseres jodreichen Sedimentgesteins mit Granit als bei der Analyse des Sediments für sich allein. Wir untersuchten, ob dies wirklich der Fall sei.

Man schloß eine Mischung von 0,5 g Kalkfels und 1,5 g Granit auf und fand 2,82 und 3,0 γ; ber. 3,1 γ, Differenz — 0,2 γ.

Es wurde somit auch hier so gut wie alles vorhandene Jod gefunden. Eine Adsorption durch die zersetzte Silikatschmelze findet also nicht statt. Trotz der ungünstigen Resultate, die wir bei Zusätzen von Kaliumjodid zu Granit erhalten haben, *glauben wir somit annehmen zu dürfen, daß unsere Untersuchungsmethode genau ist.* Jene Verluste dürften durch die besonders ungünstigen Bedingungen, wie sie bei der Untersuchung der Gesteine glücklicherweise nicht vorliegen, bewirkt worden sein.

Die Genauigkeit dieser Bestimmungen ist natürlich eine etwas relative. Ihr Grad wird vielleicht am deutlichsten, wenn wir die Berechnung an einem Beispiel zeigen. Wählen wir ein jodarmes Mineral, etwa Albit.

2 g Albit wurden mit 9 ccm Kalilauge = 6 g KOH verschmolzen, die Schmelze mit 20 ccm HCl zersetzt und mit 2 ccm K_2CO_3 wieder alkalisch gemacht.

Die kolorimetrische Bestimmung ergab 0,3 γ. Da nur vier Fünftel des Jods zur Bestimmung gelangen, muß dies Resultat mit fünf Viertel multipliziert werden: Im ganzen sind somit 0,38 γ vorhanden. Davon müssen wir einen Abzug machen für den Jodgehalt der Reagenzien. Es enthalten

9 ccm	KOH	= 0,072 γ	Jod
20 „	HCl	= 0,000 γ	„
2 „	K_2CO_3	= 0,005 γ	„
		0,077 γ	Jod

Die kleinste Jodmenge, die wir noch gut sehen können, beträgt 0,1 γ, gute Doppelanalysen pflegen bei niedrigen Jodgehalten um nicht

mehr als 0,1 γ zu differieren. Wir können die Genauigkeit in unserem Falle auf etwa $\pm$ 0,1 γ für 2 g oder $\pm$ 50 γ im Kilogramm veranschlagen. Bei höheren Gehalten wird der Fehler absolut größer, relativ nimmt er natürlich ab, wie die Versuche mit Kalkfels und Granit zeigen.

Der Jodgehalt unserer Reagenzien macht weniger aus als die von uns angenommene Fehlergrenze. Er kann als genügend gering bezeichnet werden, um solch kleine Jodmengen noch mit Sicherheit zu erfassen.

Bei dem angeführten Beispiel haben wir die mit Salzsäure zersetzte, mit Kaliumcarbonat wieder alkalisch gemachte Lösung eingedampft, mit Alkohol gefällt und den pulverigen Niederschlag abfiltriert und mit Alkohol unter scharfem Absaugen gründlich ausgewaschen. Auf diese Weise kommt man mit möglichst geringen Pottaschemengen aus. In anderen Fällen haben wir, wie das in unserer früheren Beschreibung der Methode (l. c.) angegeben ist, die Filtration dadurch umgangen, daß wir Pottaschelösung zusetzten, bis der Niederschlag einen dicken Brei bildete, von dem sich der Alkohol bequem abgießen ließ. Dazu braucht man in der Regel noch ungefähr weitere 5 ccm K_2CO_3, entsprechend 0,0125 γ Jod. Bei einer so jodarmen Pottasche wie der unserigen darf man unbedenklich so vorgehen; bei einer jodreicheren Lösung hingegen wäre das bei der Untersuchung sehr jodarmer Mineralien nicht angezeigt.

Wir verwendeten bei allen Mineralien außer in einem Falle 2 g Ausgangsmaterial und führten stets Doppelbestimmungen aus. Hier kann überall die Fehlergrenze von mindestens 50 γ im Kilogramm angenommen werden. Bei Nordlandmarmor erhielten wir bei der Verarbeitung dieser Menge keine deutliche Reaktion. Wir wiederholten deshalb die Bestimmung mit je 10 g einer Menge, die bei Carbonatgesteinen noch gut in den üblichen 400-ccm-Kolben verarbeitet werden kann. Der Fehler ist somit hier fünfmal kleiner; er beträgt etwa 10 γ.

Bei einer Reihe von Mineralien versuchten wir auch den ungefähren Bromgehalt festzustellen, wie oben angedeutet worden ist.

Der eine von uns hat schon vor einer Reihe von Jahren die Anwesenheit von Brom in manchen Produkten festgestellt, deren Jodgehalt er bestimmt hat. Besonders deutlich trat die Reaktion bei Meerwasser, Salzsolen, Mineralwässern, manchen Erden und Gesteinen auf; aber auch bei pflanzlichen und tierischen Materialien wie auch im normalen Harn konnte Brom nachgewiesen werden.

Die Reaktion besteht in folgendem:

Hat man den Jodgehalt kolorimetrisch bestimmt und setzt man Chlorwasser hinzu, um das Jod zum Zwecke der Titration zu Jodsäure zu oxydieren, so färbt sich das Chloroform bei Anwesenheit von Brom gelb.

Eine Auswertung dieser Reaktion zur quantitativen Bestimmung ist bisher aus verschiedenen Gründen unterblieben. Vor allem fehlte es an Zeit, eine genaue Methode auszuarbeiten. Sodann sind die Schwierigkeiten größer als bei der Jodbestimmung. Die Färbung ist mindestens zehnmal weniger gut sichtbar als beim Jod; die Unterschiede sind weniger scharf zu erfassen, da sich die gelbe Bromfärbung zur Vergleichung nicht so gut eignet wie die der rötlichen Jodlösung. Man fürchtete von vornherein, daß die Reagenzien sich schwerer vom Brom befreien ließen als vom Jod, und auch, daß das Brom sich den Salzrückständen durch Alkohol vielleicht weniger vollkommen entziehen lasse als das Jod, da der Verteilungsquotient zwischen den beiden Medien ein anderer sein muß. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß freies Chlor ebenso wie die beiden schwereren Halogene in das Chloroform wandert und dieses grünlichgelb färbt, wozu allerdings viel größere Mengen notwendig sind. Dadurch kann natürlich unter Umständen die bräunlichgelbe Bromfärbung vorgetäuscht werden. Diesem letzteren Übelstand muß dadurch vorgebeugt werden, daß man das Chlorwasser nur in sehr geringer Menge zusetzt und durch einen Blindversuch feststellt, daß diese Menge für sich keine sichtbare Gelbfärbung hervorruft.

Die folgende Tabelle gibt unsere Resultate wieder.

Jod- und Bromgehalte von Mineralien und Gesteinen.

	Jod γ im kg	Brom γ im kg
Gesteine.		
Granit, Fredrikshald	200	2 000
Larvikit, Larvik	300	—
Labradorfels, Ekersund	230	—
Obsidian, Island	320	—
Basalt, Daltenberg, Linz, Siebengebirge	310	8 000
Mineralien.		
Marmor, Carrara	550	—
Marmor, Velfjorden, Nordland	70	—
Titaneisen, Blaafjell, Ekersund	770	—
Hypersten, Soggendal, Ekersund-Gebiet	940	8 000
Labrador, „ „ „	440	20 000
Biotit, Kragerö	500	5 000
Hornblende, Kragerö	160	10 000
Skapolith, Risör	230	—
Sodalith, Brevik	900	$<$ 2 000
Phlogopit, Bamle, Ödegaarden	630	—
Apatit, gelb, „ „	180	—
Mikroklinperthit, Halvorsröd, Raade, Östfold	370	5 000
Albit, „ „ „	150	2 000
Muskovit, „ „ „	690	—
Flußspat, „ „ „	550	—
Rauchquarz, „ „ „	330	$<$ 2 000

Fehlergrenze: Bei Jod 50 γ (für Nordlandmarmor 10 γ), bei Brom 1000 γ.

Bei diesen großen Schwierigkeiten ist es klar, daß die Genauigkeit unserer Bestimmungen keine sehr große sein kann. Wir schätzen sie auf etwa 10 γ in 2 g oder 2000 γ im Kilogramm. Der Jodgehalt der Reagenzien selbst betrug ungefähr 10 γ, ein Wert, der jedesmal abgezogen wurde. Die Brombestimmung führten wir nicht in allen Fällen aus.

Wie aus vorstehender Tabelle hervorgeht, sind die Jodmengen, um die es sich hier handelt, durchweg gering; der größte gefundene Jodgehalt ist 900 γ oder 0,9 mg Jod im Kilogramm.

Wir haben die Werte der Einheitlichkeit halber wie in den früheren Arbeiten als γ im Kilogramm angegeben. Wir verhehlen uns nicht, daß es bei den vorliegenden Materialien eigentlich richtiger wäre, das Milligramm als Einheit zu wählen, um nicht eine Genauigkeit vorzutäuschen, die in Wirklichkeit nicht vorhanden ist.

Die Eruptivgesteine haben wir nach steigender Basizität geordnet. Wir finden überall sehr ähnliche Jodgehalte. Der Jodgehalt scheint sich nicht deutlich mit dem zunehmenden Grad der Differenzierung nach der einen oder anderen Richtung hin zu ändern.

Es läßt sich nicht sagen, in welcher Form das Jod im Urgestein vorliegt. Der nächstliegende Gedanke, daß es komplexe Verbindungen vom Typus der anderen komplexen Halogenverbindungen (Apatit, Skapolit, Sodalit usw.) bildet, läßt sich experimentell bis jetzt nicht genügend stützen; denn von unseren Mineralien zeichnen sich in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen die halogenhaltigen nicht durch besonders hohe Jodgehalte aus. Der Skapolith von Risör ist mit 230 γ direkt jodarm, während früher in einem Skapolith vom Passo Campolungo ungefähr zehnmal mehr Jod gefunden worden war. Einzig unser Sodalith zeigt einen ziemlich hohen Wert.

Ein anderer Gedanke ist der, das Jod könnte, gebunden an solche Schwermetalle, welche schwerlösliche Jodverbindungen liefern (Cu, Ag, Pb, Pd, Hg), im Magma verstreut sein. In diesem Falle würde die Geochemie des Jods mit derjenigen dieser Metalle verknüpft sein, wofür ja auch bereits Anhaltspunkte vorliegen.

Von Interesse ist der relativ hohe Jodgehalt der untersuchten Glimmer. Da diese Glimmermineralien alle von verschiedenen Vorkommen stammen, darf man vermuten, daß diese Jodgehalte nicht durch irgendwelche Umstände des Einzelvorkommens verursacht werden. Nun sind allerdings früher bei Muskovit und Biotit aus dem Kanton Wallis Gehalte von nur 350 und 330 γ gefunden worden. Damals standen nur kleine Proben zur Verfügung, so daß die äußeren Partien nicht entfernt werden konnten. Das legt den Gedanken nahe, daß jene Proben durch Auslaugung Jod verloren haben können, daß also die

ursprünglichen Glimmer vielleicht doch immer ziemlich hohe, unter sich ähnliche Jodgehalte haben könnten.

Unsere Pegmatitmineralien von Halvorsröd enthalten recht verschiedene Jodmengen. Muskovit ist am jodreichsten. Albit am jodärmsten. Dies deutet wieder auf eine Differenzierung nach chemischen Merkmalen hin.

Obschon das Jod überall verbreitet ist, so ist es doch befähigt, sich in bestimmten magmatischen Ausscheidungen etwas anzureichern. Eine sehr weitgehende Klärung dieses Problems ist von unseren wenigen Analysen einstweilen nicht zu erwarten.

Aus den wenigen Brombestimmungen geht hervor, daß der Jod- und der Bromgehalt in den einzelnen Mineralien nicht parallel zu gehen scheinen. So ist der jodreiche Hypersten bedeutend bromärmer als der nur halb so jodhaltige Labrador; beim jodreichen Sodalith ließ sich Brom kaum deutlich nachweisen. Selbstverständlich müssen die beiden Elemente mit verschiedenem Maßstab betrachtet werden, da Brom ja in weit größerer Menge vorkommt als Jod.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Jod und Brom bis zu einem gewissen Grade lithophil sind, und daß sich das Jod in einzelnen Mineralien etwas anreichert, wobei es aber nicht durchweg die halogenreichen Mineralien sind, welche auch jodreich sind.

Untersuchungen über die Einwirkung von Na_2CO_3 auf Keimung und Wachstum der Pflanzen. II.

Von

D. Fehér und **S. Vági.**

(Aus den botanischen und forstlich-chemischen Instituten der königl. ung. Hochschule für Berg- und Forstingenieure in Sopron.)

(Eingegangen am 7. Juni 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In unserer ersten Mitteilung haben wir die physiologische Wirkung von Na_2CO_3 in Kulturböden und in Wasserkulturen untersucht[1]). Der Zweck der im Anschluß daran in Gang gesetzten Untersuchungen war, die Absorption von Na_2CO_3 seitens der Pflanzenwurzeln zu bestimmen. Unsere Versuchsmethodik war möglichst einfach gewählt. Die Versuchspflanzen (Triticum vulgare) sind im voraus gezogen worden, und nur die einwandfrei gesunden Exemplare kamen in die Versuchsgefäße. Diese waren zylindrische Glasgefäße aus Jenenser Glas mit passenden Glasringen, welche mit sterilem Organtüll überzogen wurden. In die Gefäße kam destilliertes Wasser, welches mit ausgemessenen Mengen der vorher genau titrierten Sodalösungen versetzt wurde. Das Wachstum der Stämmchen sowie der Wurzeln der Versuchspflanzen wurde am Ende des Versuches ebenfalls sorgfältig gemessen und aus den Ergebnissen der Einzelbeobachtungen die Durchschnittswerte gebildet.

Nach einigen Vorversuchen wurden Versuch 1 und 2 angesetzt, deren Daten in den Tabellen I und II zusammengestellt sind. Ergänzend dazu haben wir die hauptsächlichsten Daten der Absorption

---

[1]) *Fehér* und *Vági*, diese Zeitschr. **158**, 357, 1925.

Tabelle I.

Versuch 1 (Vorversuch). Versuchspflanze: Vorbereitete und gesunde Keimlinge von Triticum vulgare. Vom 10. bis 18. April 1925.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Nr. des Gefäßes	Anzahl der Versuchspflanz.	Am Anfang des Versuches Länge		Am Ende des Versuches Länge		Wachstum während des Versuches		Proz. der ursprünglichen Länge		Na_2CO_3 in Proz. des Wassers	Der Gehalt der Lösung an Na_2CO_3		Auf eine Pflanze entfällt	Die aufgenommene Menge des Na_2CO_3	Die aufgenommene Menge des Na_2CO_3 pro Pflanze	Die aufgenomm. Menge p. Pflanze in Proz. der urspr. p. Pflanze entfall. Menge
		des Stammes cm	der Wurzel cm	des Stammes cm	der Wurzel cm	Stamm cm	Wurzel cm	Stamm	Wurzel		total g	pro ccm g	g	g	g	
1	Je 10 Stück	3,2	2,5	12,0	5,0	+ 8,8	+ 2,5	275	100	0,0738	0,1012	0,000 738	0,010 12	0,08	0,008	79,051
2		2,9	1,8	12,0	3,0	+ 9,1	+ 1,2	313,79	66,67	0,117	0,2530	0,001 17	0,025 3	—	—	—
3		1,4	1,0	6,0	1,5	+ 4,6	+ 0,5	328,57	50	0,266	0,506	0,002 66	0,050 6	0,01	0,001	19,762
4		3,4	1,0	8,0	3,5	+ 4,6	+ 2,5	135,29	250	0,322	0,759	0,000 322	0,075 9	0,1	0,01	13,175
5		3,5	2,0	5,0	3,5	+ 1,5	+ 1,5	42,86	75	0,353	0,759	0,003 53	0,075 9	0,12	0,012	15,942
6		3,0	2,0	5,0	3,0	+ 2,0	+ 1,0	66,67	50	0,595	1,0120	0,005 95	0,101 20	0,16	0,016	15,810
7		3,4	2,0	4,0	2,5	+ 0,6	+ 1,0	17,65	50	0,766	1,2650	0,007 66	0,126 5	0,2	0,02	15,810
Kontr.		1,0	1,0	8,0	2,0	+ 7,0	+ 1,0	700	100	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Tabelle II.

Versuch 2. Versuchspflanze: Vorbereitete und gesunde Keimlinge von Triticum vulgare. Vom 23. April bis 12. Mai 1925.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Nr. des Gefäßes	Anzahl der Versuchspflanz.	Am Anfang des Versuches Länge		Am Ende des Versuches Länge		Wachstum während des Versuches		Proz. der ursprünglichen Länge		Na_2CO_3 in Proz. des Wassers	Der Gehalt der Lösung an Na_2CO_3		Auf eine Pflanze entfällt	Die aufgenommene Menge des Na_2CO_3	Die aufgenommene Menge des Na_2CO_3 pro Pflanze
		des Stammes cm	der Wurzel cm	des Stammes cm	der Wurzel cm	Stamm cm	Wurzel cm	Stamm	Wurzel		total g	pro ccm g	g	g	g
1	Je 100 Stück	0,5	0,2	12	2,5	+11,5	+ 2,3	2300	1150	0,0043	0,0506	0,000 043	0,000 506	—	—
2		0,5	0,2	10	2,0	+ 9,5	+ 1,8	1900	900	0,0084	0,1012	0,000 084	0,001 012	—	—
3		0,5	0,2	12	2,0	+11,5	+ 1,8	2300	900	0,0862	0,789	0,000 862	0,007 89	0,0506	0,000 506
4		0,5	0,2	10	0,4	+ 9,5	+ 0,2	1900	100	0,210	2,53	0,002 1	0,025 3	0,1417	0,001 417
5		0,5	0,2	7	0,3	+ 6,5	+ 0,1	1300	50	0,460	5,06	0,004 6	0,050 6	0,3036	0,003 036
6		0,5	0,2	3	0,3	+ 2,5	+ 0,1	500	50	0,843	10,12	0,008	0,101 2	0,506	0,005 06
Kontr.		0,5	0,2	15	3,0	+12,5	+ 2,8	2500	1400	θ	θ	θ	θ	θ	θ

sowie den Verlauf des Wachstums in der Abb. 1 graphisch zusammengestellt.

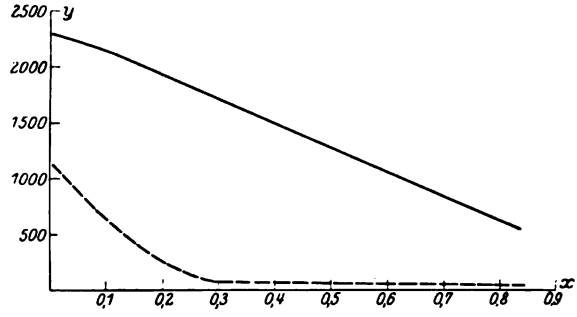


Abb. 1.
——— Stamm. – – – – – Wurzel.
x = Gehalt der Lösung an Na_2CO_3 in Proz. des Wassers.
y = Wachstum des Stammes resp. der Wurzel in Proz. der ursprünglichen Länge.

Die wichtigsten Resultate dieser Untersuchungen sind die folgenden:

1. Das Na_2CO_3 wird von den Pflanzenwurzeln in wässerigen Lösungen regelmäßig aufgenommen.

2. Mit steigenden Sodagaben wurde das Wachstum der Versuchspflanzen erheblich gehemmt. Am stärksten hat sich die hemmende Wirkung an der Entwicklung der Wurzeln geltend gemacht.

3. Mit der Vergrößerung der zugesetzten Sodamengen steigt der totale Wert der Absorption. Der prozentuale Anteil wird dagegen allmählich kleiner.

4. Durch die bisherigen Versuche glauben wir unsere Meinung erhärtet zu haben, daß die schädliche Wirkung des Na_2CO_3 hauptsächlich in den lebenden Zellen der Pflanzenwurzel endogen zur Geltung kommt.

Neuere Untersuchungen über den Jodgehalt der Schilddrüse.

Von

Eugen Hergloz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Pázmány-Péter-Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 7. Juni 1926.)

Im Jahre 1896 bewies *Baumann* (1), daß die Schilddrüse eine jodhaltige Verbindung enthält, welche er Jodothyrin nannte.

Später isolierte *Oswald* zwei Substanzen aus dem Kolloid der Schilddrüse und gab der einen den Namen Jodthyreoglobulin. Somit wendete man die Aufmerksamkeit in erhöhtem Grade dem in der Schilddrüse gebundenen organischen Jod zu. Die ersten Forscher bemühten sich, die Quantität des Jods festzustellen. *Jolin* (2) fand, daß in Schweden der Jodgehalt der Schilddrüse große individuelle Schwankungen zeigt: der festgestellte Gesamtjodgehalt variierte zwischen 0,15 bis 8,9 mg. Laut seiner Angabe wechselt der Jodgehalt mit dem Lebensalter. Den größten Jodgehalt fand er zwischen 25 bis 30 Jahren, hingegen die Drüsen der jüngeren und auch der älteren Personen enthielten viel weniger. Die späteren Forscher bestätigten diese Annahme nicht. *Aesbacher* (3) fand durchschnittlich als Gesamtmenge des Jods 6,5 mg, *Zunz* (4) aber, der die Schilddrüsen der auf dem Schlachtfelde gefallenen belgischen Soldaten untersuchte, schon viel mehr, etwa 15,0 mg. Diese Verfasser fanden in jeder einzelnen Drüse Jod, so daß die im Jahre 1922 erschienene Arbeit von *Herzfeld* und *Klinger* (5) große Überraschung verursachte, die in 36 Proz. Schweizer Schilddrüsen kein Jod fanden. Sie bezweifelten deshalb sogar, daß das Jod jedwede Rolle im Leben der Schilddrüse spielt und dadurch einen Einfluß auf den ganzen Organismus besitze, weil sie nicht voraussetzen konnten, daß alle Personen, in deren Schilddrüsen ihnen Jod nachzuweisen nicht gelungen ist, in Hypothyreose lebten, ohne daß sie klinische Symptome davon zeigten. Die Untersuchungen breiteten sich nicht nur auf normale Schilddrüsen, sondern auch auf Kröpfe aus. Wie wir aber unter anderen nach den Angaben *Hommas* (6) sehen, konnten sie in der Quantität des Jods keine bemerkenswerte Veränderung nachweisen.

Nach den vorher erwähnten Angaben zeigt das Jod nicht nur eine individuelle, sondern auch eine geographische Schwankung in der Quantität, wenn wir auch die aus verschiedenen Methoden entstandenen Unterschiede außer acht lassen.

Zu diesen Resultaten wünschte ich neue Beiträge zu liefern, indem ich mich mit dem Jodgehalt der ungarischen bzw. Budapester Schilddrüsen näher beschäftigte.

Die genaue Bestimmung des in organischer Substanz befindlichen Jods beansprucht die Bekämpfung mehrerer Schwierigkeiten.

Die Anzahl der Methoden ist sehr groß. Die meisten Verfasser empfehlen das titrimetrische Verfahren, dessen sich zuerst *Andrew Hunter* bediente. *Blum* und *Grützner* (7) unterzogen den größten Teil der Methoden einer gründlichen Kritik. Nach ihnen ist die genaue Bestimmung des Jods unter anderen von zwei Bedingungen abhängig: Der Nachweis des Jods muß 1. sicher und eindeutig, 2. sehr empfindlich sein, weil man in größeren Substanzmengen eine sehr kleine Quantität Jod bestimmen muß. Nach meiner Ansicht entspricht beiden Bedingungen das von *L. Winkler* (8) im Jahre 1915 ausgearbeitete Verfahren sehr wohl; ich könnte sagen, besser als die bisherigen Methoden. Diese Methode wurde vom Verfasser im Jahre 1922 neuerdings für kleinere Quantitäten bearbeitet, und sie hat auch den Vorteil, daß sie außerordentlich einfach und schnell ist, ohne daß es die Genauigkeit des Ergebnisses gefährdete. An organischen Substanzen bzw. Arzneimitteln stellte den ersten Versuch *Cholnoky* (9), später *Bodó* (10) an, welcher den Jodgehalt des zu Urin und Muskel gegebenen Jodkaliums mit bestem Resultat bestimmt hat.

Bei der genauen Bestimmung des in der Schilddrüse befindlichen Jods muß man außer den Fehlern der Methode noch einen Fehler ausschließen, welcher meines Wissens von den meisten Verfassern vernachlässigt wurde und welcher dadurch bedingt ist, daß das Jod im Stoff der Schilddrüse sehr ungleich verteilt ist. Die Beseitigung dieses Fehlers erreichte ich dadurch, daß ich den ganzen Drüsenstoff der Schilddrüse noch vor der Zerstörung auflöste.

Die Grundzüge der von mir angewendeten *Winkler*schen Methode sind die folgenden[1]):

Zu dem sorgfältig gereinigten und kleinwürfelig geschnittenen und in ein 200- bis 500-ccm-Becherglas gelegten Drüsenstoff gießt man zwei- bis dreimal soviel 50proz. KOH. Nach ein- bis zweistündigem Kochen im Wasserbade verflüssigt sich der Drüsenstoff derart, daß die etwa 100 bis 150 ccm dichte Flüssigkeit, mit 80 bis 100 ccm destillierten Wassers verdünnt, eine durchsichtige, homogene Lösung gibt. Die auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmende dünne Seifenschicht löst sich schnell, nachdem man etwas Wasser dazugegeben hat. Die rotbraune Lösung wird in 200- bis 300-ccm-Meßkolben nach der sorgfältigen Ausspülung des Becherglases übergeführt. Ich bemerke, daß die Verflüssigung der normalen Schilddrüsen viel glatter und schneller vor sich geht, als die der im Alter vorkommenden verkalkten und muzinose Degeneration zeigenden Drüsen. Die Bestimmung geschieht in 2 bis 5 ccm der Lösung. Zur Zerstörung dieser Menge gebrauchte ich 1 bis 3 g KOH „in substantia". Die Lösung wurde im Nickeltiegel 6 bis 10 Minuten unmittelbar über einem Bunsenbrenner gekocht. Nach der plötzlichen Abkühlung erstarrte der verkohlte Stoff in Form einer schneeweißen Masse. Durch vorsichtiges Erwärmen konnte ich zu Beginn der Zerstörung das auftretende Spritzen leicht vermeiden. Nach Auflösung des Stoffes gewann ich eine wasserklare Lösung, zu welcher ich nach Neutralisierung in schwach saurem Medium frisches Chlorwasser gab. Das überschüssige Chlor kann nach

[1]) Bei der Einübung der Methode folgte ich dem liebenswürdigen Rat des Herrn Chemiker-Assistent *E. Schulek*.

10 bis 15 Minuten langem Sieden gänzlich entfernt werden. Das gebildete Jodat wird nach Zugabe von JK und Säure mit n/100 $Na_2S_2O_3$ titriert.

Nach meiner Meinung ist dieses Verfahren exakt, doch wollte ich mich auch noch auf eine andere Weise von dem Vorhandensein des Jods überzeugen und habe das Jod in jedem Falle qualitativ nach *Schulek* in folgender Weise nachgewiesen.

Zu der nach der Zerstörung gewonnenen neutralisierten und schwach sauren Lösung gab ich so lange gesättigte H_2SO_3-Lösung, bis dessen Geruch nach Durchschüttelung bemerkbar wurde. Die Entfernung der überschüssigen H_2SO_3 kann nach 10 Minuten langem Sieden leicht erreicht werden. Nach Zugabe von 1 bis 2 Tropfen einer 1prom. Nitritlösung und einigen Tropfen 50proz. H_2SO_4 schüttelte ich das Jod mit CCl_4 aus. Die charakteristische rosige Färbung zeigte sich in den meisten Fällen sogleich, nur in ein bis zwei Fällen wurde sie erst in 1 bis 2 Stunden sichtbar.

Bei der quantitativen Bestimmung machte ich in jedem Falle zwei Proben, und es wurde der Mittelwert der Resultate gerechnet. Die Daten der meisten untersuchten Schilddrüsen enthält die folgende Tabelle.

Serienzahl	Alter Jahre	Geschlecht	Frisches Drüsengewicht g	Vorhandenes Jod (frische Drüse)	
				Absolute Menge mg	Relative Menge Prom.
1	18	♂	23,4	1,2	0,056
2	19	♀	37,2	15,3	0,41
3	23	♀	32,3	5,45	0,16
4	27	♀	18,3	3,75	0,2
5	36	♀	28,6	8,19	0,28
6	36	♂	25,73	1,81	0,07
7	43	♀	54,6	2,84	0,052
8	47	♂	23,93	7,48	0,31
9	54	♂	51,6	11,86	0,23
10	55	♂	37,3	25,7	0,68
11	55	♂	39,7	7,38	0,18
12	56	♀	26,6	6,2	0,23
13	56	♀	37,4	10,75	0,28
14	59	♀	20,55	2,58	0,12
15	59	♂	84,3	13,35	0,158
16	60	♂	81,5	15,2	0,185
17	60	♂	55,2	5,5	0,099
18	65	♀	21,09	5,5	0,25
19	67	♀	19,6	10,01	0,51
20	71	♀	20,0	1,08	0,054

Von den obigen Daten seien folgende erwähnt. Jede der untersuchten Schilddrüsen enthielt Jod. Dieser Umstand spricht jedenfalls im Sinne der älteren Auffassung, nach welcher das Jod in dem Chemismus der Schilddrüse eine beständige Rolle spielt. Ich finde es interessant zu erwähnen, daß neuerdings nach Untersuchungen von *Thomas* und *Delhaugne* (11) im Gegensatz zu den bisherigen Daten auch in den Schilddrüsen der Neugeborenen Jod nachzuweisen gelungen ist. Jedenfalls wirkt als interessanter Gegensatz die Angabe von *Herzfeld* und *Klinger*, und scheinen sie in jeder Weise die Meinung zu bestätigen, daß das in der Schilddrüse vorhandene Jod enge anthropogeographische Beziehungen hat. Selbstverständlich wären zur

Entscheidung dieser Hypothese noch viele in verschiedenen Gegenden angestellte Untersuchungen erwünscht.

Die Menge des Jods schwankt sowohl im absoluten Werte wie in relativer Beziehung zum Gewicht der Schilddrüse sehr bedeutend, welches Resultat mit den bisherigen Angaben sehr gut übereinstimmt. Die Quantität des Jods variiert in den obigen Drüsen zwischen 1,08 bis 15,3 mg, wenn wir die Drüse Nr. 10 außer acht lassen. Als Mittelwert bekam ich 8,06 mg, welcher den Angaben von *Jolin* und *Aesbacher* beinahe entspricht. In 60 Proz. der Drüsen fand ich weniger und in 40 Proz. mehr. Aus den relativen Werten gewinnen wir folgende Durchschnittsdaten: in 50 Proz. 0,09 bis 0,18 Prom., in 30 Proz. 0,20 bis 0,28 Prom. und in 20 Proz. 0,31 bis 0,51 Prom. Als Mittelwert gewann ich beinahe das Doppelte des Wertes, welchen *Herzfeld* als den größten Jodgehalt angibt.

Wenn wir nun die gewonnenen Werte vergleichen und darauf eine Antwort geben möchten, wovon die Quantität des Jods abhängt, so können wir sehr schwer einen etwaigen Zusammenhang feststellen. Der größte Teil der bisherigen Forschungen spricht dafür, daß zwischen dem Jodgehalt und dem Geschlecht, zwischen Alter und Gewicht der Drüse kein Verhältnis festzustellen ist. Auf Grund meiner Daten bin ich auch genötigt, dasselbe anzunehmen.

Castaldi (12) hat die zwischen dem Gewicht der Schilddrüse und der Körperlänge beobachtete Regelmäßigkeit in folgender Weise ausgedrückt:

$$\text{Thyreoideaindex} = \frac{100\sqrt[3]{\text{Drüsengewicht}}}{\text{Körperlänge}}.$$

Dieser Index ist nach seinen Angaben im 21. Lebensjahr 164,2. In jenen von mir aufgearbeiteten Schilddrüsen, von welchen die Daten der Körperlängen mir zur Verfügung standen, fand ich zwischen dem Thyreoideaindex und Jodgehalt folgenden Zusammenhang.

Die absolute Menge des gefundenen Jods	Durchschnittlicher Wert mg	Thyreoideaindex	Durchschnittlicher Wert
1,24	1—4	169	170,6
1,81		153,6	
2,58		187	
3,75		173	
5,45	4—8	190	186,6
5,5		174,5	
6,2		193	
7,38		203	
7,48		173	
8,19	8—12	177,5	192,2
10,75		207	
13,35	12	254	230,5
15,3		208	
15,2		255	
25,7		205	
	9,2		194,9

Ohne daß ich aus den durchschnittlichen Daten genaue Folgerungen ziehen möchte, kann man doch den Zusammenhang zwischen der absoluten Menge des Jods und dem Thyreoideaindex feststellen, nach welchem mit der Erhöhung des Index auch die Quantität des Jods in geradem Verhältnis wächst. Ich muß aber bemerken, daß in einem Falle bei einem kleinen Jodgehalt der Index 249 war, dieses entspricht also nicht der Statistik. Nach den Untersuchungen von *Reid Hunt* (13) wissen wir, daß die Stoffwechselwirkung der aus der Schilddrüse bereiteten Arzneimittel in geradem Verhältnis mit ihrem Jodgehalt steht und dadurch die Quantität des Jods zur Standardisierung der organotherapeutischen Präparate zu gebrauchen ist. Er fand auch, daß die Resistenz der Tiere gegen die letale Dose des Acetonitrils mit der dargereichten Menge der Schilddrüsen bzw. mit ihrem Jodgehalt sich erhöht. Auf solche Weise kann man ein ständiges Verhältnis zwischen dem Gewicht der Schilddrüse und der Körperlänge einerseits und zwischen der Jodquantität und der physiologischen Wirkung andererseits annehmen. Natürlich müssen noch viele Versuche angestellt werden, um eine endgültige Meinung darüber äußern zu können.

Ich erwähnte es schon bei der Erörterung meiner Methodik, daß das Jod in dem Gewebe der Schilddrüsen sich nicht in gleichmäßiger Verteilung vorfindet. Diesbezüglich führte ich meine Untersuchungen folgendermaßen durch. Aus der von Bindegewebshülle vorher sorgfältig gereinigten Schilddrüsensubstanz schnitt ich kleine Portionen aus der Mitte und solche aus dem peripherischen Teile und untersuchte jede einzelne bezüglich ihres Jodgehalts. Daneben bestimmte ich aus dem übrigen Teile der Drüse den Gehalt an Gesamtjod. So fand ich z. B. bei der Drüse Nr. 1 folgendes: 1,29 g des peripherischen Teiles enthielt 0,056 mg Jod, bis 1,5 g der zentralen Partie 0,12 mg, also beinahe das Doppelte. Was für einen großen Unterschied dies bedeutet, kann ich leicht beweisen. Wenn wir den Wert aus dem peripherischen Teile mit dem Gewicht der Drüse multiplizieren, so bekommen wir als Gesamtmenge 1,02 mg, wenn wir aber ebenfalls den zentralen Teil als Grundlage betrachten, gelangen wir zu 1,8 mg, der tatsächliche Jodgehalt hingegen war 1,2 mg. Ebensolche Daten erhielt ich bei den topographischen Untersuchungen von anderen Drüsen, welche Erscheinung ich vielleicht mit dem größeren Fett- und Bindegewebsgehalt des peripherischen Teiles der Drüse erklären möchte.

Zusammenfassung.

1. Es gelang, mit der *Winkler*schen Methode in sämtlichen Schilddrüsen Jod nachzuweisen. Obwohl die Methode nur kurze Zeit in Anspruch nimmt, liefert sie doch exakte Resultate.

2. Die Quantität des gefundenen Jods zeigt große Schwankungen, sie steht allein mit dem Thyreoideaindex in einer Beziehung, und zwar in gerader Proportion.

3. Der zentrale Teil der Schilddrüse enthält bedeutend mehr Jod als der peripherische Teil.

Literatur.

1) *E. Baumann*, Zeitschr. f. phys. Chem. **22**, 1896. — 2) *Jolin*, Hammarsten Festschrift Nr. 8, 1906, Ref. *Biedl*, Die innere Sekr. **1**, 1921. — 3) *Aesbacher*, Deutsch. med. Ztg. 1907. — 4) *Zunz*, Arch. int. de phys. 1921; Ref. Ber. üb. d. ges. Phys. **8**, 1921. — 5) *Herzfeld-Klinger*, Schweiz. med. Wochenschr. 1922. — 6) *Homma*, Grenzgebiete der Med. u. Chirurg. 1923, Ref. Ber. üb. d. ges. Phys. **21**. — 7) *Blum-Grützner*, Zeitschr. f. phys. Chem. **85**, 1913. — 8) *Winkler*, Zeitschr. f. angew. Chem. **28**, 1915; Pharm. Zentralbl. **63**, 1922. — 9) *Cholnoky*, Pharm. Zentralhalle 1924, S. 65. — 10) *Bodó*, diese Zeitschr. **161**, 1925. — 11) *Thomas-Delhaugne*, Virchows Arch. **26**, 1924. — 12) *Castaldi*, Arch. it. anat. **18**, 1921; Ref. *Biedl*, Inn. Sekr. — 13) *Reid Hunt*, Amer. Journ. of Phys. **63**, 1923; Arch. of int. Med. **35**, 1925.

Über Harnstoff bei Bakterien.

Von

Nicolai N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg-Leningrad.)

(Eingegangen am 12. Juni 1926.)

In einer meiner Abhandlungen, die in dieser Zeitschrift[1]) veröffentlicht sind, habe ich in reinen Kulturen verschiedener Pilze das Vorkommen von Harnstoff konstatiert und mich darüber folgendermaßen geäußert: „Außerdem müssen noch in betreff der Harnstoffbildung unter passenden Bedingungen Hefen und Bakterien untersucht werden. Alle diese Probleme sind für mich von großem Interesse, und gegenwärtig stelle ich ergänzende Versuche an." In dieser Abhandlung veröffentliche ich einige vorläufige Daten in betreff der Frage über die Harnstoffbildung bei Bakterien.

In den vorhergehenden Versuchen haben die zu den verschiedensten Klassen gehörigen Pilze bei der Kultur auf einem an Eiweißstoffen reichen Substrat [Gelatine, Pepton[2])] stets Harnstoff ausgeschieden. Zu dieser Reihe von Erscheinungen sind auch die Versuche von *G. Guittonneau*[3]) mit denjenigen Mikroorganismen zu zählen, welche auf einem an organischen Stoffen reichen Boden leben und ein Mycel aus feinen verzweigten Fäden bilden; diese vom Autor als Microsiphonées bezeichneten Organismen bilden bedeutende Mengen Harnstoff im Falle der Entwicklung auf Pepton.

Kann man bei verschiedenen Gruppen von Pilzen eine gewisse Einförmigkeit in ihrem Stickstoffhaushalt auffinden, so ist es unmöglich, dasselbe auch für Bakterien festzustellen, da die Stickstoffaufnahme derselben voneinander sehr verschieden ist. In betreff der Harnstoffanhäufung habe ich eine Reihe von Mikroben untersucht, die sich auf Gelatine und Pepton entwickeln; die Resultate fielen ver-

[1]) *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **157**, 229, 1925 (eingegangen am 2. Februar 1925).

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **162**, 425, 1925.

[3]) *G. Guittonneau*, C. r. **278**, 1383, 1924.

schieden aus; in einigen Fällen wurde Harnstoff angehäuft, in anderen fehlte derselbe gänzlich.

Die Bakterienkulturen für meine Arbeit erhielt ich aus den hiesigen mikrobiologischen Laboratorien und spreche dafür Dr. *O. Schulgina* und Dr. *A. Moschkowa* meinen Dank aus.

Ursprünglich wurde folgendes Medium gewählt:

Pepton	1 g
Liebigs Extrakt	0,5 g
Gelatine	10 g
Kochsalz	0,5 g
Leitungswasser	bis 100 ccm

In Reagenzröhren wurde zu je 10 ccm Substrat versetzt und Bakterien ausgesät.

Nach elfmonatiger (20. Januar bis 17. Dezember 1925) Entwicklung der Kulturen bei Zimmertemperatur war die Gelatine in den Reagenzröhren völlig flüssig geworden und der Gehalt an Harnstoff (nach *R. Fosse*) betrug im Reagenzrohr mit Bac. megatherium — 14,56 mg, mit Bac. tumescens — 21,90 mg. Diese Bakterien häuften bei wiederholten Versuchen bei kürzerer Entwicklungszeit stets Harnstoff an, während Bac. pyocyaneus, Bac. fluorescens, Bac. coli commune beständig negative Resultate gaben.

Ich führe hier noch einige Versuche an. Substrat: 10 Proz. Gelatine, 1 Proz. Pepton, 0,1 Proz. KH_2PO_4, 0,04 Proz. $MgSO_4$, 0,14 Proz. Na_2CO_3, Spuren von $FeSO_4$ und $Ca_3(PO_4)_2$.

B. megatherium.

A. In einer Kultur auf 10 ccm Substrat bei 30 bis 32° C erwies sich

nach 12 Tagen	2,86 mg	Harnstoff
„ 18 „	4,5 „	„

B. Dasselbe bei 28 bis 30° C

nach 18 Tagen	3,50 mg	Harnstoff
„ 26 „	6,80 „	„
„ 40 „	7,88 „	„

B. tumescens.

Auf demselben Substrat, wie im vorhergehenden Versuch, in 10 ccm, bei 30 bis 32° C:

nach 6 Tagen	2,03 mg	Harnstoff
„ 12 „	4,04 „	„

Die Niederschläge von Harnstoff in Form von Dixanthylharnstoff wurden mikroskopisch untersucht, der Schmelzpunkt bestimmt und in einigen Fällen wurde der Niederschlag zur Bestimmung der Stickstoffmenge verbrannt.

Niederschlag von Dixanthylharnstoff 67,0 mg ergab 4,36 mg N oder 6,51 Proz. N. Theoretisch 6,66 Proz. N.

In Analogie zu meinen Resultaten bei niederen Pilzen machte ich die Annahme, daß sich der Harnstoff in diesem Falle aus dem Arginin des Substrats (Gelatine und Pepton) bilde. Zum Beweis dieser Hypothese setzte ich einen Versuch mit einem Medium auf einem Gemisch von Aminosäuren an. Zu 200 ccm Nährlösung von Mineralsalzen, wie im vorhergehenden Versuch, wurden hinzugefügt: 5 g Alanin, 2 g Asparagin, 0,1 g Leucin, 0,1 g Tyrosin; es wurde zu je 10 ccm genommen und besät:

B. megatherium. Nach 25 Tagen bei 30° C:

A. 10 ccm Aminosäurelösung 0 mg Harnstoff.

B. 10 ccm Aminosäurelösung + 0,1 g Argininnitrat[1]) 12,1 mg Harnstoff.

In der Portion A, auf Aminosäuren, erwies sich keine Spur von Harnstoff, trotzdem aber war die Entwicklung der Mikroben eine gute, was man nach der großen Menge des in dieser Portion gebildeten Ammoniaks beurteilen konnte. Harnstoff wurde nur in Gegenwart von Arginin erzeugt. Zur Erzielung von Harnstoff muß man die Entwicklung der Bakterien, welche langsam verläuft, abwarten. Viel bessere Resultate erreicht man, wenn man vorher auf Agar mit Pepton das Bac. megatherium kultiviert und hernach eine Argininlösung hinzufügt.

Im Verlauf von 6 Tagen bei 30° C auf Agar mit Pepton entwickelte sich das Häutchen von Bac. megatherium, und dann wurden 4 ccm einer vorher sterilisierten Argininnitratlösung von einem Gehalt von 50 mg Trockensubstanz hinzugefügt; nach weiteren 6 Tagen war der Versuch beendet und in der von Agar abgegossenen Flüssigkeit erwiesen sich 6,34 mg Harnstoff. Hieraus folgt, daß bei guter Entwicklung der Kultur schon 6 Tage genügen, um die Hälfte der zugefügten Menge Arginin unter Bildung von Harnstoff zu zersetzen. Die Harnstoffbildung in Bakterienkulturen erklärt sich dadurch, daß unter gegebenen Verhältnissen bei den Bakterien kein Ureaseferment gebildet wird, auf dessen Existenz bei denselben stets hingewiesen wird[2]), während die das Arginin spaltende Arginase vorhanden ist. Die Frage über die Arginase der Bakterien wird in letzter Zeit im Laboratorium des Prof. *A. Kossel* ausgearbeitet. *Saburo Hino*[3]) hat verschiedene Bakterien auf Arginin mit Mineralsalzen kultiviert und gefunden, daß einige derselben, wie z. B. Bac. pyocyaneus und Bac. fluorescens, sich bei Gegenwart von Arginase und Urease entwickelten, andere aber, wie Bac. coli, wahrscheinlich keine Urease hervorbrachten, da in der Kultur-

[1]) Dieses Präparat verdanke ich Prof. *C. Neuberg* in Berlin-Dahlem.

[2]) *Tetsugora Takahata*, diese Zeitschr. **140**, 166, 1223.

[3]) *Saburo Hino*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 100, 1924.

flüssigkeit kein Ammoniak gebildet wurde. *A. Kossel* und *F. Curtius*[1]) haben gezeigt, daß Pyocyaneusemulsion nur die Hälfte des zugefügten l, d-Arginius zersetzte, da nur das l-Arginin zurückbleibt, welches dann von den Autoren durch Flaviansäure gefällt wurde.

Die weit verbreitete Entwicklung der Arginase in den Bakterien und das Fehlen der Urease in einzelnen Fällen gibt die Möglichkeit, verschiedene Bakterien in betreff der Harnstoffbildung zu untersuchen. Alle bisher angestellten Versuche erwiesen im Nahrungssubstrat *weder Glucose, noch Mannit oder Glycerin.* Es ist möglich, daß in Gegenwart von überschüssiger Kohlenstoffnahrung, nach der Analogie mit Pilzen, kein Harnstoff gebildet wird. Versuche in dieser Richtung werden weiter geführt.

Schlußfolgerungen.

Die Kulturen von Bakterien Bac. megatherium und Bac. tumescens auf Pepton mit Gelatine und auf Aminosäuren mit Arginin bilden bedeutende Mengen Harnstoff.

Harnstoff wird aus Arginin gebildet.

---

[1]) *A. Kossel* und *F. Curtius*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 148, 283, 1925.

Über proteolytische Fermente im Serum. II.

Von

Hans J. Fuchs.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

In einer kürzlich erschienenen Arbeit[1]) habe ich nachgewiesen, daß Serum von Pferd, Hammel und Rind zugesetztes artfremdes Fibrin so verändert, daß ein großer Teil des darin enthaltenen Stickstoffs dialysabel wird und mit Hilfe der modernen Mikromethoden in der Außenflüssigkeit genau erfaßt werden kann, daß sogar bei passender Ausgestaltung der Versuchsbedingungen sehr erhebliche Mengen Fibrin restlos dem Abbau zugeführt werden können.

Demgegenüber wurde bei keiner der genannten Serumarten die Fähigkeit gefunden, arteigenes Fibrin auch nur spurenweise anzugreifen. Der Vorgang, durch den der Abbau artfremden Fibrins erfolgt, darf als Fermentvorgang betrachtet werden, weil er durch zugesetzte Abbauprodukte, sogar durch Wiederzusatz der Außenflüssigkeit gehemmt wird, weil er eine weitgehende Spezifität besitzt und weil er mit hitzeinaktiviertem Serum nicht zu erzielen ist.

Nicht aufgeklärt werden konnte bis jetzt die Beständigkeit arteigenen Fibrins gegenüber den Serumfermenten. Da wir bis jetzt maßgebliche Unterschiede im Aufbau der verschiedenen Fibrine nicht kennen, muß an eine der Möglichkeiten gedacht werden, durch die sonst an sich mögliche Fermentprozesse hintangehalten werden: Antifermente oder Schutz des Fibrins durch gewisse chemisch-physikalische Eigentümlichkeiten des Serums.

Die Untersuchungen von *Abderhalden* haben ergeben, daß in gewissen Fällen Umstimmungen im Serum erfolgen, die einen Abbau blutfremder Eiweißkörper ermöglichen, die sonst einer Spaltung durch Serum nicht ausgesetzt sind, z. B. Placenta-Eiweiß während der Gravidität, Eiweiß maligner Tumoren bei Tumorträgern.

Ich habe mich deshalb der Aufgabe zugewandt, zu untersuchen, ob auch das Fibrin zu den Eiweißkörpern gehört, die in abnormen Fällen dem Angriff des Serums zugänglich werden, und zwar habe ich diese Fragestellung aus äußeren Gründen zunächst an Menschenfibrin

[1]) Diese Zeitschr. **170**, 76, 1926.

und Serum von Carcinomkranken und mit Hilfe derjenigen Methodik geprüft, die in der genannten Mitteilung beschrieben ist.

Die unmittelbare Veranlassung waren Beobachtungen bei Pferdetumoren, von denen mir zufällig mehrere zur Verfügung standen. In den drei Fällen, die ich untersuchen konnte, wurde normales Pferdefibrin, das sonst vom Pferdeserum kaum spurenweise angegriffen wird, weitgehend abgebaut.

Tabelle I.

5,0 ccm Pferdeserum + 1,0 g normales Pferdefibrin im Dialysierschlauch, 25,0 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit. Milligramm N in 25,0 ccm Außenflüssigkeit.

Stunden	Normal	Ca		
24	0,0014	17,78	17,22	14,77
48	0,0021	40,04	28,21	26,88
96	0,0021	43,47	38,43	36,82

Das Ergebnis dieser Versuche in Tabelle I zeigt also eindeutig, daß das Auftreten maligner Geschwülste beim Pferde zu einer Veränderung im Blute führt, die einen Abbau von normalem Pferdefibrin durch das (pathologische) Serum ermöglicht.

Mit dieser Erfahrung ging ich nunmehr an die Untersuchung menschlicher Fälle heran.

Als erstes mußte die Frage geklärt werden, von welcher Höhe an die N-Werte im Dialysat als abnorm angesehen werden könnten. Kleine Mengen von Stickstoff müssen jederzeit in die Dialysate hineingelangen, da die Rest-N-Körper im Serum diesen Weg gehen müssen.

Ich brachte in die Dialysierhülsen 5,0 ccm von dem zu untersuchenden Serum. Von diesem ist bei vollkommen normaler Beschaffenheit des Serums eine Rest-N-Ausbeute von etwa 1,5 mg zu erwarten. Durch etwaige interkurrente Krankheiten waren aber Steigerungen über diesen Wert hinaus möglich.

Da in den nachfolgenden Tabellen die N-Werte auf die gesamte am Schluß des Versuchs vorhandene Flüssigkeit (Serum + Außenflüssigkeit) berechnet wurden, muß also als Minimum des Normalwerts die Menge von 1,5 mg N angesehen werden, während als Maximum eines Rest-N-Wertes ohne hervortretende klinische Erscheinung das doppelte Quantum angenommen werden darf.

Tatsächlich fanden sich nun in einzelnen Fällen von Nephrosclerose u. a. noch höhere N-Werte, so daß ich sicheren Abbau erst von einer Menge von 10,0 mg dialysablem N annahm.

In nachstehender Tabelle II habe ich eine Übersicht über die mit der früher beschriebenen Methodik an 101 Fällen der verschiedensten Erkrankungen gewonnenen Resultate zusammengestellt:

Tabelle II.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	N mg
1	*B. Sch.*	26	Bronchitis, Hämorrhoiden, Acne	0,540
2	*J. T.*	76	Ca oesophagi	19,168
3	*A. J.*	58	Ulcus ventriculi	0,420
4	*W. K.*	61	Ca ventriculi	17,556
5	*F. R.*	44	Ca hepatis	19,424
6	*I. B.*	52	Ca ventriculi	14,868
7	*A. G.*	63	Ca laryngis	17,556
8	*A. M.*	23	Tumor spinalis caud.	19,320
9	*A. K.*	74	Ca ventriculi	14,028
10	*P. L.*	29	Ulcus ventriculi	1,268
11	*R. Schn.*	44	Ca ventriculi	14,248
12	*J. S.*	52	Ca hepatis	16,968
13	*A. F.*	66	Ca ventriculi	16,548
14	*P. L.*	29	Ulcus ventriculi	0,504
15	*H. K.*	68	Ca ventriculi	15,708
16	*H. G.*	45	Hyperacidität	1,680
17	*F. Tsch.*	18	Salvarsanschädigung	1,260
18	*R. Kn.*	75	Ca ventriculi	18,504
19	*P. M.*	62	" "	17,136
20	*K. P.*	60	Tumor cerebri	18,732
21	*A. K.*	68	Ca hepatis	18,984
22	*J. V.*	68	Ca cardiae	16,968
23	*K. W.*	68	" "	18,396
24	*K. M.*	66	Ca oesophagi	22,344
25	*M. Sch.*	46	Ulcus ventriculi	0,060
26	*H. P.*	67	Ca ventriculi	16,710
27	*A. G.*	27	Neurasthenie	0,060
28	*K. Sk.*	45	Ca ventriculi	18,984
29	*E. R.*	32	Nihil	0,060
30	*J. Sch.*	57	Ulcus ventriculi	1,260
31	*T. Schw.*	52	Ca oesophagi	18,816
32	*P. Sch.*	58	Ca cardiae	17,724
33	*L. W.*	53	Ca ventriculi	19,236
34	*H. W.*	54	Nephrosclerose	2,016
35	*W. L.*	52	Insuff. cordis, Oedema crurum	0,756
36	*Sch.*	—	Neurasthenie	0,300
37	*P. K.*	39	Ca coeci	21,000
38	*A.*	—	Ca hepatis	20,160
39	*W. F.*	76	Ca ventriculi	24,108
40	*W. M.*	65	Ca cardiae	15,120
41	*X.*	—	Ca ventriculi	20,412
42	*S.*	—	Ca oesophagi	16,710
43	*K. N.*	—	Ca ventriculi	15,120
44	*R. Kn.*	75	" "	14,964
45	*X.*	—	" Darm-Ca	15,960
46	*T.*	—	Ca hepatis	23,520
47	*J. P.*	33	Funktionelle Magenbeschw.	3,024
48	*A. F.*	45	Ca ventriculi	19,320
49	*H. Sch.*	59	" "	21,168
50	*O. B.*	47	Spast. Obstipationen	2,956
51	*R. H.*	57	Ulcus duodeni	2,184
52	*E. R.*	42	Ca ventriculi	18,300
53	*A. B.*	57	Nephrosclerose	2,436

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	N mg
54	*J. V.*	68	Ca cardiae	19,908
55	*J. W.*	40	Hyperacidität	1,932
56	*J. B.*	76	Innere Organe o. B.	2,400
57	*P. W.*	42	Achyl. gastr.	5,376
58	*P. B.*	52	Neurasthenie	1,176
59	*E. B.*	64	Ca ventriculi	21,168
60	*J. R.*	48	Bronchitis	2,400
61	*J. F.*	66	Ca oesophagi Wa. R. —	21,420
62	*R. F.*	69	Ca cardiae	22,260
63	*J. R.*	—	Anacidität des Magens	4,248
64	*H.*	—	Ca oesophagi	14,800
65	*K.*	—	Ca ventriculi, Verdacht	9,300
66	*X.*	—	Hodgin. Mediastinaltumor	7,620
67	*Sch.*	—	Nasen-Ca-recidiv	12,810
68	*M.*	—	Ca ventriculi	13,730
69	*K.*	—	„ „	26,460
70	*S.*	—	Ca oesophagi	12,516
71	*S. P.*	—	„ „	12,660
72	*R. F.*	44	Ca hepatis	15,564
73	*X.*	—	Ca ventriculi	16,338
74	*K.*	—	Ca hepatis	13,272
75	*W.*	—	Ca ventriculi	14,700
76	*P.*	—	Ca recti	12,726
77	*B.*	—	Ca ventriculi	15,666
78	*R.*	—	Ca pylori	17,094
79	*X.*	—	Magen-Ca	18,060
80	*K.*	—	Ca recti	16,800
81	*L. Sch.*	—	Leber-Ca u. Ikterus	15,020
82	*K. K.*	—	Ca ventriculi	16,716
83	*G. U.*	—	„ „	12,432
84	*P.*	—	Ca hepatis	13,758
85	*P. K.*	23	Tbc. pulm.	20,964
86	*A. B.*	51	Pneumonie	17,388
87	*K. M.*	62	Aortitis luetica	13,860
88	*O.*	—	Schwangerschaft	0,060
89	*W.*	—	Leberlues	11,440
90	*K. Sch.*	—	Aortitis luetica	12,016
91	*R.*	—	Schwangerschaft	2,004
92	*F.*	—	„	1,176
93	*Sch.*	—	Tbc. pulm.	18,200
94	*R.*	—	Schwangerschaft	3,192
95	*G. H.*	33	Emphys. pulm.	16,968
96	*K*	—	Ca penis, vor 20 Tg. Extirpation	10,920
97	*L.*	—	Lippen-Ca, vor 20 Tg. Extirpation	9,240
98	*W.*	—	Ca ventriculi, lt. Laparatomie inoperabel	20,160
99	*T.*	—	Schwangerschaft	1,392
100	*K.*	—	„	5,376
101	*X.*	—	Ca-Verdacht	9,072
96a	*K.*	—	Ca penis, vor 40 Tg. Emuskulination	2,016
96b	*K.*	—	„ „ 50 „ „	1,176
97a	*L.*	—	Lippen-Ca, vor 40 Tg. Extirpation	3,024
97b	*L.*	—	„ „ 50 „ „	0,756

Aus den vorstehend zusammengestellten Untersuchungen geht hervor, daß beim Vorliegen maligner Tumoren eine Veränderung des Blutes eintreten kann, und in allen hier angeführten Fällen eingetreten ist, bei der das Serum die Fähigkeit erlangt, arteigenes Normalfibrin abzubauen. Prinzipielle Unterschiede infolge des Sitzes oder der Verschiedenheit des Typus der Tumoren sind nicht vorhanden.

Es war nun festzustellen, ob diese Umstellung des Serums nur für maligne Tumoren charakteristisch ist, oder ob sie in ähnlicher Weise auch bei anderen abnormen Zuständen des Organismus eintritt.

Zunächst war dabei an Schwangerschaft zu denken, bei der sich ja die von *Abderhalden* gemachten Feststellungen am klarsten abzeichnen.

Ich stelle deshalb in der nachstehenden Tabelle III eine Reihe von Untersuchungen an Schwangerenseren zusammen. Es ist daraus klar ersichtlich, daß die Schwangerschaft dem Serum nicht die Fähigkeit erteilt, arteigenes Fibrin abzubauen.

Tabelle III.

Name des Patienten	Alter (Jahre)	Diagnose	N mg
R.	28	Schwangerschaft mens. VII	2,107
K. V.	34	„ „ V	3,262
X.	—	„ „ ?	0,637
K. Sch.	32	„ „ VI	1,435
M. N.	31	„ „ VII	1,050

Bei der bisher eingehaltenen Methodik hängt die Genauigkeit der Reaktion von der Qualität des Dialysierschlauches ab, und diese ist trotz sorgfältigster Voreichung und zartester Behandlung bei häufigem Wechsel nie absolut zuverlässig, zumal manches Mal bei 30 Sekunden langem Kochen zwecks Sterilisierung die Schläuche defekt wurden.

Ich versuchte deshalb die Technik so umzugestalten, daß der Dialysierschlauch in Fortfall kam.

Allerdings hatten schon meine in anfangs erwähnter Arbeit angestellten Versuche ergeben, daß die optimalen Abbaubedingungen bei Dialyse gegen dem Serum isotonische Salzlösungen liegen. Da aber die Fehlermöglichkeit selbst bei exaktestem Arbeiten bei dauerndem Wechsel der Schläuche zu groß ist, sind quantitativ geringere Abbauwerte noch immer dem größeren, aber nie sicher genauen der Dialyse vorzuziehen.

Die nächstliegende Methode war, den Abbauvorgang statt im Dialysierschlauch im Reagenzglas vor sich gehen zu lassen. Daß die Abbauwerte bedeutend geringer sein würden, war sicher zu erwarten.

Wenn sich aber ergab, daß sie noch sicher meßbar waren, so war diese Methodik der oben angegebenen im Dialysierschlauch unbedingt vorzuziehen.

Ich versuchte deshalb durch Benutzung bekannter optischer Methoden die Feststellung des Abbaues, die mittels der Mikrokjeldahlmethode nur zeitraubend und kostspielig durchzuführen ist, möglichst einfach zu halten.

Das mir vom Pharmakologischen Institut freundlichst zur Verfügung gestellte Pulfrichrefraktometer wurde zunächst in der von *B. Wagner*[1]) angegebenen Gebrauchsart zur Prüfung einer reichlichen Anzahl Untersuchungen verwendet. Es waren bei einigen positiven Seren geringfügige Abweichungen der Vergleichsmessungen zwischen Serum und Serum + Normalfibrin zu finden. Trotzdem wurden trotz sorgfältigster Technik einige Fehldiagnosen erhalten, die im Verein mit der Tatsache, daß die subjektive Fehlergrenze in gleicher Höhe mit wirklichen Abbauveränderungen stand, zur Aufgabe dieser Methodik zwangen.

Weitere Versuche mit dem von dem Hygienischen Institut mir freundlichst zur Verfügung gestellten äußerst empfindlichen *Zeiss*schen Interferometer ergaben bei sorgfältigster Ausführung alle möglichen Abweichungen von den auf chemischem Wege gewonnenen Resultaten, so daß auch diese Methodik sich als viel weniger zuverlässig erwies, als sich die Mikrokjeldahlmethode bei allen bisherigen Untersuchungen gezeigt hatte.

Aus diesen Gründen blieb ich bei der Reststickstoffbestimmung mittels Mikrokjeldahl, zumal es mir — wie nachstehend beschrieben — gelang, eine einfache, qualitativ und quantitativ sichere Enteiweißungsmethode zu ermitteln, und die von mir modifizierte Mikrokjeldahlapparatur so sicher und zuverlässig arbeitet, daß — unter Voraussetzung peinlichster Sorgfalt, genauester Meßpipetten und reinster Chemikalien — einfache N-Bestimmungen an Stelle der üblichen Doppelbestimmungen gesetzt werden können.

Methodik.

Für jedes Serum werden zwei Reagenzgläschen von etwa 15,0 ccm Fassungsvermögen numeriert und aufgestellt. In das eine kommt eine geringe Menge (etwa 5,0 mg) staubfein pulverisiertes Normalmenschenfibrin. Das spontan geronnene Blut wird abzentrifugiert, das Serum in ein Reagenzgläschen überführt und gut durchgeschüttelt. Mit einer 1,0-ccm-Präzisionsvollpipette, die durch mehrmaliges Hochziehen mit dem zu untersuchenden Serum durchspült war, wird in beide Reagenzgläschen

[1]) Tabellen zum Eintauchrefraktometer. Sondershausen, Selbstverlag, 1907.

genauestens je 1,0 ccm Serum eingebracht, wobei man die Flüssigkeit von oben senkrecht auf den Boden der Gläschen fallen läßt, um das Fibrin tüchtig aufzuwirbeln und gut mit dem Serum zu vermischen. Die Pipette wird jedesmal sorgfältig ausgeblasen.

Die Reagenzgläser werden unverkorkt zusammen mit einem dritten, mit Chloroform gefülltem in ein Standglas gesetzt und dieses mit einer darauf gelegten Glasplatte verschlossen.

Nach 24 Stunden Aufenthalt bei 39 bis 40° C im Brutschrank werden die Sera nach *Folin-Wu* enteiweißt:

In jedes Gläschen werden genauestens 7,0 ccm Aqua dest. + 1,0 ccm einer 10proz. Natrium-Wolframatlösung + 1,0 ccm einer $^2/_3$ n Schwefelsäure einpipettiert, die Röhrchen gründlich geschüttelt, 15 Minuten stehengelassen und sodann ihr Inhalt durch Blaubandfilter von 7 cm Durchmesser in andere Reagenzgläschen wasserklar filtriert.

Von dem Filtrat werden zweimal je 3,0 ccm mit Präzisionsvollpipette in Mikrokjeldahlkolben gebracht, verbrannt und der darin enthaltene Stickstoff festgestellt.

Schon die ersten Versuche zeigten, daß — wenn in auch sehr geringem Maße — Differenzen zwischen dem Stickstoffgehalt des Filtrats von Serum allein und Serum + Substrat bei Tumorfällen zu finden waren, während bei normalen Seren nur Differenzen auftraten, die viel geringer waren als bei Tumorseren und aus der Methodik zu stammen schienen. Infolgedessen waren die nächsten Untersuchungen darauf gerichtet, eine einfachere und für diesen Zweck geeignetere Enteiweißungsmethode zu finden. Denn es war vor allen Dingen zu berücksichtigen, daß die größte Fehlermöglichkeit beim Zusatz der drei verschiedenen Flüssigkeiten zur Enteiweißung selbst bei sorgfältigstem Arbeiten lag. Von allen durchgeprüften Methoden der Enteiweißung hat sich die mit 2,5proz. Trichloressigsäure als die in diesem Falle beste erwiesen.

Alma Hiller und *Donald D. van Slyke*[1]) haben eingehend festgestellt, daß 2,5proz. Trichloressigsäure nicht nur am besten quantitativ alles hochmolekulare Eiweiß im Serum fällt, sondern daß auch die hydrolytische Zersetzung des Niederschlags bei längerem Stehen gleich Null ist. Dazu kommt noch der technische Vorteil, daß die Zurückhaltung von Flüssigkeit im Niederschlag bei dieser Enteiweißungsmethode erheblich geringer ist als bei der nach *Folin-Wu*, und daß die Filtration viel rascher vor sich geht.

Die Methodik wurde also dahin abgeändert, daß an Stelle der drei Flüssigkeiten nur die 2,5proz. Trichloressigsäure allein verwendet wurde. Und zwar haben quantitative Untersuchungen an gleichem Serum ergeben, daß der Zusatz von 11,0 ccm 2,5proz. Trichloressigsäure zu 1,0 ccm Serum das Optimalverhältnis ist.

Jede Untersuchung gestaltet sich also derart, daß das zu prüfende Blut nach spontaner Gerinnung abzentrifugiert und das so erhaltene Serum in ein Reagenzglas übertragen wird. Darauf kommen, wie vorstehend beschrieben, zweimal je 1,0 ccm Serum in ein leeres und in ein mit Substrat beschicktes Reagenzgläschen. Diese werden zusammen mit einem mit Chloroform gefüllten Reagenzglas 24 Stunden bei 39 bis 40° C gehalten.

Nach Ablauf dieser Zeit werden sie herausgenommen, in jedes kommen mit gleicher genauer Präzisionsvollpipette je 11,0 ccm 2,5proz. Trichloressigsäurelösung, daraufhin werden sie kräftig unter Schaumbildung geschüttelt

[1]) Journ. of biol. Chem. 53, 253.

und 15 Minuten stehengelassen. Dann wird ihr Inhalt durch gewöhnliche Schleicher-Schüll-Filter von 7 cm Durchmesser in andere saubere Gläschen filtriert, wobei genauestens darauf zu achten ist, daß die ersten Tropfen des Filtrats wasserklar sind. Sind sie trübe — was sehr selten vorkommt —, so läßt man ruhig weiter filtrieren und schickt nach dem zehnten Tropfen wasserklaren Filtrats die gesamte Flüssigkeit nochmals durch das gleiche Filter in ein anderes Gläschen. Dem Filtrat werden zweimal je 4,0 ccm mit gleicher Präzisionsvollpipette entnommen und in Mikrokjeldahlkolben überführt. Die Pipette muß bei jedem neuen Filtrat ausgewaschen und sorgfältigst getrocknet werden.

Die Doppelbestimmungen müssen selbstverständlich so weit übereinstimmen, daß der Fehler höchstens ein Zehntel der bei abbauenden Seren ersichtlichen Differenz zwischen Serum und Serum + Substrat beträgt. Sonst ist das ganze Resultat unbedingt zu verwerfen.

Über 100 nach diesem neuen Verfahren angestellte Untersuchungen ergaben, daß die dabei aufgefundenen Abbauwerte bei exaktem Arbeiten genügen, um sicher erkannt zu werden.

Tabelle IV.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	1 ccm Serum + 11,0 ccm 2,5 proz. Trichloressigsäure, davon je 3 ccm Filtrat gestützt durch ccm n/200 H_2SO_4	
				ohne Fibrin	*mit Fibrin*
124	*Ch. H.*	55	Tumor in Nabelgegend	0,92 0,99	1,98 1,99
125	*C. L.*	7	Ca ventriculi	2,64 2,70	3,15 3,18
126	*B.*	30	Ca peritonei	2,45 2,48	3,11 3,08
127	*A. N.*	62	Ca ventriculi	3,20 3,25	4,18 4,16
128	*J. K.*	65	Magen-Ca	2,15 2,19	2,98 2,00
129	*J. St.*	56	Cardia-Ca	2,20 2,18	2,73 2,78
130	*T. Sch.*	—	Lebertumor, operiert	2,71 2,69	3,70 3,68
131	*H. R.*	39	Lungentumor	2,75 2,72	3,10 3,12
132	*L.*	50	Ca d. retroperiton. Drüsen	2,27 2,24	3,80 3,76
133	*J.*	45	Cholecystitis, Lebertumor	2,38 2,39	2,82 2,84
134	*E.*	45	Ca vesic. felleae	2,16 2,20	3,09 3,08
135	*N.*	47	Pylorusca	2,25 2,25	2,84 2,89
136	*J. F.*	49	Sekundäre Anämie, Subacidität, Dyspepsie	1,83 1,78	1,79 1,82
137	*S.*	51	Ulcus ventr.	1,86 1,84	1,90 1,89
138	*Sch.*	59	Arteriosclerose	2,81 2,84	2,88 2,86
139	*H. Th.*	37	Ulcus ventr.	2,16 2,19	2,18 2,20

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	1 ccm Serum + 10 ccm 2,5proz. Trichloressigsäure, davon je 3 ccm Filtrat gestützt durch ccm n/200 H_2SO_4	
				ohne Fibrin	*mit Fibrin*
140	*M. K.*	39	Peritonitis	1,39 1,34	1,39 1,45
141	*J. P.*	35	Chron. Gastroenteritis, also keine Infektion	1,52 1,54	1,53 1,48
142	*K.*	20	Gravida mens. X	1,78 1,75	1,74 1,78
143	*A. J.*	47	Verdacht auf Cervix-Ca, histologisch negativ	2,34 2,34	2,37 2,37
145	*T.*	—	Symptome e. Tumors d. r. Pallidum, Obduktion +	2,47 2,50	3,05 2,99
147	*A. A.*	59	Infiltration der l. Mamma, Chirurg. Klinik, positiv	3,73 3,73	4,39 4,46
148	*S.*	52	Ulcus ventr.	2,91 2,92	2,89 2,93
149	*G.*	—	Operation: Magen-Ca mit vielen Metastasen	3,72 3,66	4,45 4,45
150	*M.*	—	Operation: Ca hepatis	2,60 2,62	3,10 3,15
151	*J. I.*	63	Ulcus ventr.	2,64 2,58	2,59 2,62
152	*A. K.*	40	Sanduhrmagen	2,35 2,40	2,38 2,40
153	*P. F.*	50	Subacidität, Hepatitis	2,78 2,76	2,78 2,84
154	*H. D.*	—	Subacidität	2,53 2,51	2,51 2,51
155	*G. V.*	—	1921 Ca portio oper., Metastasen Kachektisches Aussehen	2,22 2,25	2,74 2,85
156	*L.*	31	Ca ventr.	2,29 2,33	3,13 3,09
157	*K. K.*	60	„ „	1,80 1,86	2,35 2,38
158	*J. W.*	49	Ca cardiae	2,08 2,06	2,84 2,78
159	*P. G.*	69	Ödem an den Beinen, subikt. Verfärbung	1,78 1,80	1,81 1,81
160	*C.*	50	Ca pylori	1,69 1,67	2,62 2,67
165	*A. St.*	63	Anacidität des Magens	1,56 1,60	1,58 1,60
166	*M.*	56	Querschnittslähmung	1,81 1,80	1,82 1,79
168	*Sch.*	43	Ca ventriculi, Säurewerte 0: 9. Rö. Großer Füllungsdefekt a. d. gr. Kurvatur	2,54 2,55	3,00 3,06
169	*E. G.*	60	Ca ventr., operativ bestätigt	2,40 2,42	2,88 2,87
170	*D.*	23	Obduktion: Mal. Tumor, linke Kleinhirnaffektion	1,98 2,05	2,50 2,52
173	*P. B.*	28	Ca ventr., Säurewerte 0:8, Gew.-Abn. Rö. Def.	1,88 1,88	2,48 2,40

Diese Übersicht über 50 nach der neuen Methode verarbeitete Fälle zeigt, daß die, wenn auch kleineren, Titrationswerte eine sichere Entscheidung zulassen.

Beim Fehlen von malignem Tumor betrug die frei werdende Stickstoffmenge nicht über 0,002 mg, so daß die von mir als Schwelle genommene Zahl von 0,007 das reichlich Dreifache der schon sehr hoch angenommenen Fehlergrenze darstellt. Im ganzen wurden zunächst 103 Fälle untersucht, auf deren Ausführung im einzelnen der Kürze halber verzichtet werden darf. Ich stelle sie daher statistisch in der folgenden Tabelle V zusammen, die auch die vorerwähnten 50 Fälle enthält.

Tabelle V.

Anzahl	Klinische Diagnose	Ca R positiv	Ca R negativ
48	Ca ventriculi	48	0
4	Ca pylori	4	0
2	Ca mammae	2	0
3	Ca hepatis (2mal kein Tumor palpabel)	3	0
4	Maligne Abdominaltumoren	4	0
2	Ca recti	2	0
3	Gehirntumoren	3	0
4	Lungentumoren	4	0
1	Mammainfiltration	1	0
1	Leberanschwellung + Ascitis	0	1
1	Cholelithiasis + Hydrops ves. fell.	0	1
3	Magenektasien	0	2
5	Ulcus ventriculi	0	5
3	An- bzw. Hyperacidität des Magens	0	3
2	Ulcus duodeni	0	2
1	Nierenbeckenreizung	0	1
1	Nikotinherz	0	1
4	Insuff. cordis	0	4
1	Floride Lungentbc.	1!!!	0
1	Milzextirpation + Subacidität des Magens	0	1
2	Arteriosclerosen	0	2
1	Benignes Osteom d. Wirbelsäule	0	1
1	Hodgkin, Anfangsstadium	0	1
1	Perniciöse Anämie	0	1
2	Basedow Struma magna	0	2
1	Dysenterie	1!!!	0

Diese Aufzählung in Tabelle V enthält zwei Fälle, in denen die „Ca R" positiv wurde, in denen aber die klinische Diagnose nicht auf Ca lautete. Der eine dieser Fälle ist eine Lungentuberkulose, der andere ein Fall von Dysenterie. In diesem letzten ist die positive Diagnose deshalb zunächst besonders erstaunlich, weil in dem oben angeführten Fall 141 (chronische Gastroenteritis) eine negative Diagnose erhalten

worden war. Der Unterschied dürfte sich dadurch erklären, daß es sich um eine einfache chronische Gastroenteritis ohne Allgemeinerscheinungen handelte, während im erwähnten Dysenteriefalle bereits ein Übergehen der Erreger ins Blut stattgefunden hatte, wie der Untersuchungsbefund des Hygienischen Instituts zeigte. Die beiden Fälle erweckten zusammen mit den schon erwähnten Ergebnissen der ersten Methode[1]) den Verdacht, daß alle Infektionskrankheiten oder wenigstens die, die das Blut in Mitleidenschaft ziehen, diesem ebenfalls die Fähigkeit erteilen, Normalfibrin abzubauen.

Ich habe deshalb zunächst systematisch eine Reihe von sicheren Infektionsfällen untersucht.

Tabelle VI.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	1 ccm Serum + 11 ccm 2,5 proz. Trichloressigsäure, davon je 8 ccm Filtrat: ohne Fibrin gestützt durch ccm n/200 H_2SO_4	mit Fibrin gestützt durch ccm n/200 H_2SO_4
317	*I. P.*	—	Lues	3,56	3,80
321	*M. Sch.*	12	Tuberkulose	4,24	4,52
323	*H. V.*	49	Nasentumor: Lues	3,03	3,38
339	*W. K.*	49	Lungentuberkulose	4,11	4,52
341	*P.*	42	Typhus abd.	4,00	4,38

Ausnahmslos ist in allen diesen Fällen der Fibrinabbau erfolgt. Durch dieses Verhalten ist es unmöglich geworden, aus der bloßen Tatsache des Abbaues von Normalfibrin durch Patientenserum auf das Vorliegen eines malignen Tumors bei diesen Patienten zu schließen.

Dies ist besonders bedenklich, weil die geprüften Infektionsarten sich in manchen Fällen — z. B. beginnender Tuberkulose — der klinischen Diagnose entziehen und dadurch Fehlschlüsse hervorrufen können.

Es drängte sich nun durch eine Reihe von weiteren Beobachtungen die Vermutung auf, daß das Fibrin Carcinomatöser im Gegensatz zu normalem Fibrin einem Angriff des Serums nicht ausgesetzt sein kann; bei einem etwaigen Abbau von Fibrin wären Veränderungen in der Gerinnungsgeschwindigkeit zu erwarten gewesen. Die Feststellung der Blutgerinnungszeiten bei Ca-Kranken ergab jedoch keine wesentliche Abweichung von der Norm, übrigens auch nicht bei Infektionskranken.

Die Untersuchung wurde mit einer einfachen und sicheren, eigens konstruierten Apparatur vorgenommen, die möglichst fehlerfreies Arbeiten gestattet.

[1]) Am Ende von Tabelle II.

Auf einen Objektträger wird ein etwa 1 mm hoher Glasring von 10,0 mm Durchmesser aufgekittet und seine Oberfläche plan geschliffen. Auf dem elektrisch heizbaren Objekttisch des Mikroskops, der mit einer Kappe bedeckt ist, durch die nach Öffnen eines Deckels das Objektivs des Mikroskops eingeführt werden kann, befindet sich auf zwei Lagern ein Halter für obenbeschriebenen Objektträger. Dieser ist so gebaut, daß er mit dem Objektträger wie ein Wagebalken nach rechts oder links in der Längsrichtung geneigt werden kann und in jeder Stellung verharrt. Das Blut wird nach Reinigung der Fingerbeere durch Einstich und nach Fortwischen des ersten Tropfens direkt auf ein Deckgläschen gebracht und dieses sofort auf den mit Vaseline bestrichenen Glasring gelegt, so daß sich der Bluttropfen in einer luftdichten Kammer von sehr kleinem Fassungsvermögen befindet. Dadurch wird nach Möglichkeit Verdunsten des Wassers verhütet, und gleichzeitig gibt der vorgewärmte Objektträger rasch seine Wärme an den Bluttropfen ab. Durch ein schwaches Objektiv wird nun festgestellt, wie lange sich die Blutkörperchen infolge der schiefen Lage bewegen. Haben sie sich sämtlich nach der tiefliegenden Seite angesammelt, so wird der Objektträger nach der anderen Seite gekippt.

Die Zeit bis zur Gerinnung wurde vom Augenblick der Entnahme bis zur vollständigen Bewegungslosigkeit aller Blutkörperchen gemessen. Die Resultate bei Parallelbestimmungen differierten bei sorgfältigem Arbeiten um höchsten 2 Sekunden.

Tabelle VII.

	Gerinnungszeit	
	I	II
Normalblut	2′ 32″	2′ 30″
„	2 14	2 16
„	2 30	2 31
Magen-Ca-Blut	2 52	2 51
Cardia-Ca-Blut	2 12	2 14
Leber-Ca-Blut	2 38	2 41
Luesblut	2 54	2 53
„	2 44	2 43
Darmtuberkuloseblut	2 08	2 05
Lungentuberkuloseblut	2 46	2 52

Ein völlig analoges Ergebnis zeigen die in nachstehender Tabelle VIII dargestellten Mikrokjeldahl-Untersuchungen.

Tabelle VIII.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	1 ccm Serum + 11 ccm 2,5proz. Trichloressigsäure, davon je 8 ccm Filtrat gestützt durch ccm n/200 H_2SO_4		
				ohne Fibrin	mit Normalfibrin	mit Ca-Fibrin
304	*A. J.*	55	Magen-Ca	2,40	3,52	2,42
305	*B. St.*	48	Anacidität	3,06	3,09	4,05
326	*Sch.*	—	Penistumor*)	4,68	4,62	4,98
340	*K. K.*	42	Ca ventr.	3,45	3,85	3,44
342	*G. W.*	52	Ca oesophagi	4,70	5,09	4,73
346	*J. B.*	—	Mal. Knochentumor	3,03	3,40	3,06

*) Dieser stellte sich histologisch als papillomatöse Ausbreitung benigner Art heraus.

Tabelle VIII zeigt nun in der Tat, daß Fibrin aus Ca-Plasma von dem Serum anderer Ca-Träger nicht angegriffen wird, daß es dagegen vom menschlichen Normalserum genau so wie artfremdes Fibrin abgebaut wird, daß genau umgekehrt normales Fibrin vom Serum Carcinomatöser abgebaut wird, während es von Normalserum nicht verändert wird.

Infektionssera bauen, wie nachstehender Auszug aus zahlreichen Untersuchungen zeigt, beide Fibrinarten ab, und zwar in wechselndem Maße einmal das eine, ein anderes Mal das andere stärker (Tabelle IX).

Alle Einzelheiten dieses Befundes bedürfen der Aufklärung. Ich habe auch schon in mehreren Richtungen Versuche aufgenommen, deren Ergebnisse in späteren Arbeiten veröffentlicht werden sollen.

Ich verschaffte mir ferner Fibrin von Lues-, Scharlach- und Tuberkulosefällen. Von diesen mußte das Tuberkulosefibrin von den weiteren Untersuchungen ausgeschaltet werden, weil es sich herausstellte, daß es schon gegen Salzlösungen so empfindlich war, daß auf ein differentes Verhalten gegen verschiedene arteigene Sera nicht zu rechnen war.

Einige orientierende Versuche am Schluß der Tabelle IX bestätigen das.

Es erschien nun nicht ausgeschlossen, daß das Serum, das auf den Abbau des durch Tuberkulin veränderten Fibrins eingestellt ist, auch mit dem eigenen Eiweiß der Tuberkelbazillen reagieren könnte, und ich habe deshalb das Serum solcher Fälle mit dem nachfolgend beschriebenen, aus käuflichen Tuberkulinpräparaten hergestellten Substrat in Reaktion gebracht und in der Tat einen Abbau festgestellt.

Als sicherstes Substrat erwies sich das mit 2,5proz. Trichloressigsäure ausgefällte, sorgfältig ausgewaschene und bei 40° C getrocknete Alttuberkulineiweiß *Koch*.

Zu 20,0 ccm Alttuberkulin *Koch* wurden 200,0 ccm 2,5proz. Trichloressigsäure *Merck* zugesetzt, der Niederschlag nach zweistündigem Stehen abzentrifugiert, fünfmal wieder mit Aqua dest. aufgeschwemmt, gründlich geschüttelt und abzentrifugiert. Der letzte Niederschlag wurde auf Glasschälchen ausgebreitet und bei 40° C getrocknet. Das Ergebnis war etwa 0,2 g gelblicher Substanz, die im Mörser staubfein pulverisiert wurde. Ihr Verhalten ist genau analog den Fibrinen: normale Sera, Ca-Sera und Infektionssera, mit Ausnahme von Tuberkulose, bauen es ab. Tuberkulosesera lassen es intakt.

Wenn wir nun das Resultat der ganzen letzten Tabellen zusammenfassen, so müßte sich die Möglichkeit ergeben, maligne Tumoren auch in solchen Fällen sicher zu erkennen, wo klinisch eine Differentialdiagnose zwischen ihnen und Lues oder Tuberkulose nicht ohne weiteres durchführbar ist. Zugleich müssen auch diese Infektionskrankheiten mit dem Verfahren diagnostizierbar sein. Natürlich fordert eine ent-

Tabelle IX.

1 ccm Serum + Substrat, 24 Stunden bei 40° C, + 11 ccm 2,5 proz. Trichloressigsäure, davon 8 ccm Filtrat.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	ccm n/200 H_2SO_4					
				Ohne Fibrin	Mit Normalfibrin	Mit Ca-Fibrin	Mit Luesfibrin	Mit Scharlach-fibrin	Mit Tuberkulose-fibrin
353	*E. M.*	57	Lues Wa R +	3,18	3,60	4,23	3,17	—	—
356	*X.*	—	„ „	3,81	4,12	4,34	3,84	—	—
357	*A. F.*	25	„ „	3,96	4,62	4,81	3,94	—	—
357a	*A. F.*	25	„ „	3,79	4,10	4,61	3,76	4,63	—
364	*A. R.*	42	Infektiöse Pleuritis	3,68	4,23	4,00	—	4,14	—
366	*W. G.*	—	Lues	3,75	4,02	4,20	3,70	—	—
360	*V.*	52	Oculomotoriuslähm.	4,50	4,52	4,63	5,14	—	5,83
362	*R. H.*	60	Lungentumor	3,77	4,49	3,75	—	—	5,28
363a	*X.*	—	Lungentuberkulose	4,88	5,42	5,51	—	—	5,94
363b	*A. R.*	—	„	4,63	5,26	5,31	—	—	5,74

Tabelle X.

1 ccm Serum + Substrat, 24 Stunden bei 40° C, + 11 ccm 2,5 proz. Trichloressigsäure, davon 8 ccm Filtrat.

Nr.	Name des Patienten	Alter (Jahre)	Klinische Diagnose	ccm n/200 H_2SO_4					Chemische Diagnose	Klinischer Endbefund
				Ohne Fibrin	Mit Normal-fibrin	Mit Ca-Fibrin	Mit Luesfibrin	Mit Tuberkulin-eiweiß		
388	*W.*	—	Ca? Lues?	4,02	4,06	4,52	4,35	4,54	negativ	Gesunder Patient (Prüfung der Reaktion!)
396	*H. T.*	49	Fast völlige Erblind. Ca? Lues?	2,34	2,77	2,70	2,32	—	Lues +	Wa R *nachher* positiv!
397	*W.*	64	Starker Ikterus, höckerige Leber. Leber-Ca? Magen-Ca?	3,34	3,38	3,68	—	—	negativ	Lebercirrhose
399	*B.*	44	Ca ventriculi?	5,64	5,88	5,68	5,83	5,99	Ca +	Operativ bestätigt
404a	*F.*	5	Tumor? Infektion?	3,83	4,04	4,26	4,18	3,85	Tbk. +	Meerschw.-Impf. Tbk. +
414	*M. J.*	18	Lues? Tuberkulose?	2,24	2,23	2,58	2,56	2,72	negativ	Als Simulant entlarvt
435	*M. R.*	45	„ „	3,72	4,41	—	3,70	4,28	Lues +	Latente Lues +
438	*H. P.*	38	Lues? Wa R?	4,25	4,56	—	4,25	—	Lues +	Luesverdacht Wa R −
445	—	—	Tuberkulose? Ca?	4,64	5,25	4,64	5,17	—	Ca +	Sarkom

sprechende Durcharbeitung eines Falles eine entsprechende Menge von Material und steigert das Maß der aufzuwendenden Arbeit.

In der Tabelle X berichte ich über eine Reihe von Fällen, in denen mir die Diagnose vollständig unbekannt war und in denen mir die Aufgabe gestellt war, die Krankheit festzustellen.

Zum Schluß möchte ich noch die Frage erörtern, ob Aussicht besteht, bei systematischer Anwendung meines Untersuchungsverfahrens auf alle eines malignen Tumors verdächtigen Fälle zu einer zuverlässigen Serodiagnose der malignen Tumoren zu gelangen.

Daß für ein solches Verfahren insbesondere zur Stützung der Frühdiagnose das Bedürfnis vorhanden ist, braucht wohl nicht im einzelnen erörtert zu werden.

Von einem serodiagnostischen Verfahren muß verlangt werden, daß es möglichst in allen Fällen, in denen die gesuchte Erkrankung vorliegt, positiven, in sämtlichen anderen Fällen, auch da, wo andere Erkrankungen vorliegen, negativen Ausschlag gibt.

Wenn ich mein Material nach diesen Gesichtspunkten untersuche, so sehe ich mich genötigt, eine Reihe von Fällen auszuschließen, in denen der Patient nach der Untersuchung die Poliklinik nicht wieder aufsuchte und in denen der einmalige klinische Untersuchungsbefund nicht ausreichte, um das Vorliegen eines malignen Tumors mit Sicherheit festzustellen oder auszuschließen. Im ganzen genügen von den untersuchten 450 Fällen 382 den hier formulierten Bedingungen. Von diesen Fällen wurden klinisch 126 Fälle als sichere Tumoren malignen Charakters bezeichnet. Von diesen Fällen erwiesen sich fünf als negativ insofern, als sie Normalfibrin intakt ließen und Carcinomfibrin abbauten. Nach Abgabe meines Untersuchungsergebnisses erfuhr ich, daß drei von diesen Seren dem gleichen Patienten entstammten, der ein schweres Oesphagus-Ca hatte und kurze Zeit danach ad exitum kam. Von den beiden anderen Fällen war der eine ebenfalls ein Oesophagus-Ca, der andere ein Larynx-Ca.

In der folgenden Tabelle XI fasse ich die Einzelheiten des Materials zahlenmäßig zusammen, und es ergibt sich vor allem aus der Betrachtung dieses unbekannterweise dreimal untersuchten Falles, daß hier nicht etwa irgendwelche Zufälligkeiten oder technische Fehler in Frage kommen, sondern daß offensichtlich eine Gesetzmäßigkeit vorliegt, die wir noch nicht erfassen können. Da in diesem Falle, abgesehen von einer Dilatation der Speiseröhre, kein irgendwie differenter therapeutischer Eingriff gemacht worden war, liegt es nahe, die spezifische Beschaffenheit des Tumors für den Ausfall der Reaktion verantwortlich zu machen. Indessen kann hierüber nur ein breites Material Sicherheit verschaffen.

Tabelle XI.

Nr.	Patienten		Klinische Diagnose	ccm n/200 H_2SO_4		
	Name	Alter (Jahre)		ohne Fibrin	mit Normal-fibrin	mit Ca-Fibrin
Der gleiche Fall 306	*K. K.*	64	Oesophagusstenose	6,01	6,04	6,52
Der gleiche Fall 307	*H. W.*	58	„	5,42	5,48	6,32
Der gleiche Fall 308	*H. G.*	56	Magenschmerzen, Erbrechen Subac.	5,92	5,93	6,39
295	*B.*	—	Larynx-Ca	7,08	7,04	7,43
331	*P.*	51	Magenca	5,77	5,44?	5,72

Bei im ganzen drei von 129 Fällen hat also mein Verfahren einen sicher vorhandenen malignen Tumor nicht angezeigt.

Die übrigen 253 Fälle meines Materials wiesen keine klinisch erkennbaren Anzeichen für das Vorliegen eines malignen Tumors auf; in keinem dieser Fälle schlug mein Verfahren nach der positiven Seite aus[1]).

Im ganzen befinden sich also unter 382 sicher diagnostizierten Fällen drei Fehlresultate, was 0,8 Proz. entspricht, ein Prozentsatz, der sich noch unter dem anderer serodiagnostischer Untersuchungsmethoden allgemeiner Anwendung hält.

Diese prozentualen Ergebnisse meiner bisherigen Untersuchungen möchte ich aus dem Grunde nicht als definitiv ansehen, da mir in der ersten Zeit besonders viel klinisch sichere Tumorfälle zur Untersuchung gestellt wurden. In der Praxis würden vermutlich diejenigen Fälle stärker hervortreten, die lediglich durch äußere Anzeichen tumorverdächtig erscheinen, und es mag sein, daß sich damit eine Verschiebung des Prozentverhältnisses einstellen kann. In einem großen Prozentsatz dieser Fälle wird es sich um latente Tuberkulose oder andere schleichende Infektionskrankheiten handeln, die mit Hilfe meines erweiterten Verfahrens ebenfalls erkennbar sind.

Wenn ich daher auch nicht behaupten will, daß es zurzeit schon möglich ist, mit Hilfe meines Verfahrens jeden malignen Tumor zu erkennen, so glaube ich doch, daß man in einer ganzen Reihe von unklaren Fällen mit Hilfe meines Verfahrens zur Stützung einer einfachen oder Differentialdiagnose gelangen kann.

---

[1]) In einem klinisch negativen Falle, den ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. *Stepp* (Jena) verdanke, wurde positives Resultat erhalten. Hier war, wie bei einigen anderen Untersuchungen, nicht meine sonst geübte Technik eingehalten worden, sondern ich hatte versucht, die Auswertung meiner Resultate auf interferometrischem Wege vorzunehmen. Da sich aber die Interferometrie — wie bereits erwähnt — als wenig geeignet erwies, glaube ich diese Fälle ausschalten zu dürfen.

Es ist unmöglich, im Rahmen dieser Arbeit sämtliche Befunde einzeln abzuhandeln. Die in den einzelnen Tabellen angeführten Fälle sollen nur ein einigermaßen übersichtliches Bild von den zahlreichen Gesamtuntersuchungen geben.

Zusammenfassung.

Fasse ich die berichteten Tatsachen übersichtlich zusammen, so ergibt sich folgendes:

1. Normales Serum baut artgleiches Normalfibrin *nicht* ab, dagegen jedes artgleiche pathologische Fibrin.

2. Pathologisches Serum baut artgleiches *gleich*pathologisches Fibrin *nicht* ab, dagegen artgleiches Normalfibrin und artgleiche *anders*-pathologische Fibrine.

3. Dieses Verhalten ist bei malignen Tumoren — gleichgültig ob Carcinom, Sarkom oder Chondrom usw. — ebenso wie bei Lues und Scharlach das vollständig gleiche.

4. Bei Tuberkulose verhält sich das aus tuberkulösem Blut gewonnene Fibrin insofern anders, als es im Gegensatz zu allen anderen Fibrinen schon gegen physiologische Kochsalz- oder Ringerlösung sehr wenig widerstandsfähig ist. Infolgedessen ist die Hauptbedingung der als Substrat verwendeten Fibrine: Unlöslichkeit, nicht erfüllt. Als Substrat wird ein aus Alttuberkulin gewonnener unlöslicher Eiweißniederschlag verwendet, der sich analog den anderen Fibrinsubstraten verhält.

Weitere Untersuchungen sind dauernd im Gange.

Ich spreche Herrn Prof. *Bittorf* von der medizinischen Universitäts-Poliklinik und seinen Herren Assistenten für weitgehendes Entgegenkommen und reichliche Belieferung mit Untersuchungsmaterial meinen besten Dank aus. Herrn Prof. *Schmitz*, dessen Freundlichkeit und Unterstützung in jeder Beziehung ich die Anstellung der Untersuchungen über proteolytische Fermente im Serum verdanke, gestatte ich mir, auch an dieser Stelle ergebenst zu danken.

Die Fermente der Haut. V.

Von

J. Wohlgemuth.

Atmung und Glykolyse der Haut und ihre Beeinflussung durch Hormone.

Von

E. Klopstock.

(Aus der chemischen und dermatologischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

I.

In den vorausgegangenen Mitteilungen konnte berichtet werden, daß der Nachweis eines reichen Fermentbestandes in der menschlichen und tierischen Haut geglückt ist.

Wohlgemuth und *Yamasaki*[1]) fanden daselbst verhältnismäßig große Mengen von Diastase, Lipase, Katalase, Phenolase; ferner ein autolytisches Ferment sowie ein peptolytisches. *Wohlgemuth* und *Klopstock*[2]) haben in ihr eine Gelatinase und ein gut wirksames nucleinsäurespaltendes Ferment nachgewiesen; ferner konnten sie Differenzen in der Verteilung der Enzyme über die verschiedenen Körperregionen, sowie Verschiedenheiten in der Haut von Erwachsenen und Säuglingen feststellen. *Wohlgemuth* und *Sugihara*[3]) wiesen nach, daß die Haut von Lebenden und die von Leichen in ihrem Fermentbestand keine wesentlichen Unterschiede zeigt, daß tierische Haut fermentreicher zu sein pflegt als menschliche, daß zwischen dem Gehalt an Enzymen in Blut und Haut kein direkter Parallelismus besteht, und daß die verschiedenen Strahlenarten, wie Sonne, künstliche Höhensonne, Ultrasonne und Röntgenstrahlen teils zu einer Vermehrung (Phenolase), teils zu einer Verminderung (Diastase, Lipase) der Fermente in der Haut führen können. Und endlich konnten *Wohlgemuth* und *Nakamura*[4]) zeigen, daß die Haut in hohem Maße befähigt ist, Poly-, Di- und Monosaccharide auf oxydativem Wege abzubauen und aus ihnen Acetaldehyd zu bilden.

---

[1]) *Wohlgemuth* und *Yamasaki*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 25; diese Zeitschr. **147**, 203, 1924.

[2]) *Wohlgemuth* und *Klopstock*, diese Zeitschr. **158**, 487, 1924.

[3]) *Wohlgemuth* und *Sugihara*, ebendaselbst **168**, 260, 1925.

[4]) *Wohlgemuth* und *Nakamura*, ebendaselbst **178**, 258, 1926.

Alle diese Untersuchungen waren teils mit Extrakten aus Haut, teils mit mechanisch stark zerkleinerter Haut angestellt worden. Es galt nun, einen Einblick zu gewinnen in das Stoffwechselgetriebe der Hautzelle selber, solange sie aus dem Zellverband noch nicht gewaltsam herausgelöst ist. Für dieses Studium verfügen wir über zwei für jede Zelle charakteristische physiologische Vorgänge: die Atmung und die Glykolyse. *Warburg*[1]) und seinen Schülern ist es in erster Linie zu verdanken, auf die Wichtigkeit dieser beiden Zellfunktionen für den Ablauf der Lebensvorgänge in lebenden und überlebenden Organen hingewiesen und ihr Studium ermöglicht zu haben. Eine überaus geistvolle und exakte Methodik ist von ihm geschaffen worden, die es erlaubt, quantitativ beide Vorgänge an Gewebsschnitten zu verfolgen. Das Prinzip der Methode ist im wesentlichen, unter aeroben und anaeroben Bedingungen das Auftreten und Verschwinden von Gasen volumetrisch zu bestimmen. Bei der Atmung wird durch einen im Experimentiergefäß befindlichen Trog mit Kalilauge die sich bildende Kohlensäure absorbiert, so daß die Sauerstoffzehrung quantitativ gemessen werden kann. Bei der anaeroben Glykolyse wird die auftretende Kohlensäure bestimmt, die durch Freiwerden aus dem Bicarbonat infolge der Milchsäurebildung aus Zucker entsteht. Wird Atmung und Glykolyse gleichzeitig unter physiologischen aeroben Bedingungen zu messen gesucht, dann wird bei zwei möglichst gleichen Gewebsschnitten unter verschiedenen Raumbedingungen die Gasvolumenänderung festgestellt und rechnerisch das Auftreten der Extrakohlensäure und das Verschwinden von Sauerstoff gefunden.

Bei menschlicher Haut gelingen die Rasiermesserschnitte des Gewebes in der erforderlichen Dicke (Höchststärke 0,2 mm) bei einiger Übung leicht. Dickere Schnitte wurden in der endgültigen Berechnung nicht verwertet. Als Apparatur benutzten wir die hierfür von *Warburg* geschaffene.

Was zunächst die *Atmung* anbetrifft, so lag uns daran festzustellen, welche Normalwerte lebensfrische menschliche Haut hat, und inwieweit sich die Haut frischer Leichen, die an verschiedenen Krankheiten in verschiedenen Lebensaltern zugrunde gegangen sind, anders verhält. Von einer ausführlichen Darstellung der Protokolle sehen wir ab, möchten aber in einem Beispiel, das wir in extenso mitteilen, illustrieren, wie wir in allen unseren Versuchen vorgegangen sind. Für diesen Versuch wurde die überlebende Haut von einem wegen Gangrän frisch amputierten Unterschenkel genommen.

---

[1]) *Warburg*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923; *S. Minami*, ebendaselbst **142**, 334, 1923; *Warburg, Posener* und *Negelein*, ebendaselbst **152**, 51 und 309, 1924.

Tabelle I.

Atmungsversuch. Temperatur 37,5°.

Ablesung nach	Manometer	Versuch	Ablesung nach	Manometer	Versuch
0′	15,0	19,95	75′	14,9	14,9
15	15,0	18,85	90	14,8	13,8
30	15,1	18,0	105	14,9	12,7
45	15,05	16,95	120	15,0	11,7
60	15,0	15,9			

Schnittgewicht 12,3 mg. Schnittdicke 0,2 mm. $Q_{O_2} = -3{,}8$.

Für unsere Versuche an überlebender Haut standen uns Männer und Frauen[1]) im Alter von 22 bis 67 Jahren zur Verfügung, bei denen infolge irgend einer Erkrankung die Amputation eines Gliedes vorgenommen werden mußte. Meistens handelte es sich um Diabetes, Arteriosklerose, Carcinom, Sepsis, gutartige Tumoren usw.; mitunter erhielten wir auch normale, frische Haut von plastischen Operationen.

Die Werte, die wir für die Atmung fanden, werden nach *Warburg* ausgedrückt als $Q_{O_2} = \frac{\text{Kubikzentimeter verbrauchten } O_2}{\text{Stunde . mg Gewebe}}$.

Nahmen wir die oberste Hautschicht, die sich mikroskopisch aus reinem Epithel zusammensetzt, so erhielten wir folgende Werte:

$Q_{O_2} = -2{,}8, -2{,}2, -2{,}2, -1{,}8, -1{,}2, -1{,}3, -3{,}8, -1{,}45, -1{,}0, -3{,}6$. Der Durchschnittswert für Q_{O_2} ist demnach $-2{,}1$.

Verwandten wir nicht die alleroberste Hautschicht, sondern eine tiefere Lage, so bekamen wir folgende Resultate:

$Q_{O_2} = -0{,}8, -0{,}34, -0{,}7, -0{,}6$, sehr klein, $-2{,}0$. Hiernach ist der Durchschnittswert für Q_{O_2} etwa $-0{,}75$. Dabei zeigte sich: Je größer im Gewebsschnitt der Anteil an Epithel war, desto mehr näherte sich der Wert dem ersten Durchschnittswert für Q_{O_2}. Überwog in dem Hautschnitt der Anteil des Bindegewebes, so sank der Wert für Q_{O_2} und näherte sich dem Nullpunkt. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung von *Warburg*, *Posener* und *Negelein* (l. c. S. 329), wonach der Stoffwechsel des Bindegewebes (Muskelfaszie von Ratten) minimal ist.

Vergleichen wir die Atmungswerte mit den an tierischer Haut (Meerschweinchen, s. unten) gefundenen, so sehen wir, daß diese kräftiger atmet als die menschliche Haut. Für jene (oberste Hautschicht) ergibt sich als Durchschnittswert von 14 Bestimmungen $Q_{O_2} = -3{,}0$. — Ein

[1]) Den Herren *Christeller*, *Mühsam*, *Stickel* und *Unger* möchten wir auch an dieser Stelle für Lieferung des Materials unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Vergleich mit der Atmung anderer menschlicher Organe ist nur in beschränktem Umfang möglich, da bisher nur von zwei untergeordneten die Atmungsgröße bekannt ist, und zwar von normaler Lymphdrüse und normaler Rachenmandel. Hier beträgt nach *Warburg* der Wert für $Q_{O_2} = -3{,}8$ bzw. $-5{,}1$. Demnach ist die Atmung der Haut von derselben Größenordnung wie die der Lymphdrüse; denn wir begegneten auch hier Werten von $-3{,}6$ und $-3{,}8$ (s. oben).

Um die Frage des Überlebens der Haut beim Absterben des ganzen Organismus zu klären, untersuchten wir Gewebsschnitte von Leichenhaut 1 bis 60 Stunden post exitum. Die verschiedensten Todesursachen und Lebensalter, sowie beide Geschlechter wurden benutzt. Für die oberste Schicht waren unsere Resultate:

$Q_{O_2} = -0{,}88, -1{,}2, -2{,}2, -3{,}0, -4{,}0, -2{,}8, -2{,}04, -2{,}0, -1{,}0 -1{,}5, -1{,}0, -1{,}2, -2{,}2 -3{,}3$. Durchschnitt: 2,0.

Tiefere Schichten:

$Q_{O_2} = -0{,}3$, sehr klein, $-0{,}5$, sehr klein, sehr klein, klein, klein, $-1{,}2$, $-1{,}0$, $-0{,}6$. Durchschnitt: etwa $-0{,}4$.

Auch hier gilt, daß der gefundene Wert proportional der im Schnitt enthaltenen Epithelmenge ist.

Gefrierschnitte von überlebender Haut ergaben für die oberste Schicht: $Q_{O_2} = -0{,}7$, tiefe Lage $-0{,}1$.

Es zeigte sich also, wie zu erwarten war, daß durch den groben Eingriff des Gefrierens die Atmung erheblich geschädigt wurde. Dagegen hat der Tod des Gesamtorganismus auf die das Leben so eminent charakterisierende Eigenschaft der Atmung der Haut zunächst keinen irgendwie nennenswerten Einfluß. Es zeigt sich also beim Atmungsferment das gleiche Verhalten wie bei den anderen Hautfermenten: Der Tod führt nicht sofort zu einer Abnahme der Fermente in der Haut; sie können hier noch lange Zeit in ungeschwächtem Maße fortbestehen. Im Gegensatz dazu ist bekanntlich die Atmung anderer Organzellen (Carcinom, Muskel usw.) weit empfindlicher gegenüber dem Sistieren der Zirkulation.

Ein gewisses Abweichen von der Norm ergab sich bisweilen aber doch in der Atmung der Leichenhaut, und zwar dann, wenn wir die Versuche über mehrere Stunden hinaus fortführten. Während lebensfrische Haut stundenlang gleichmäßig atmete, beobachteten wir bei der Leichenhaut mitunter von der dritten Stunde ab, jedoch nicht immer, eine Unregelmäßigkeit im Sauerstoffverbrauch. Offenbar verliert die Zelle der Leichenhaut bisweilen schneller ihre Vitalität als die der lebensfrischen Haut.

Ein etwas deutlicherer Unterschied ließ sich aber bei der Verfolgung der *anaeroben Glykolyse* erkennen. In diesen unseren Versuchen hielten

wir uns gleichfalls genau an die Vorschriften von *Warburg*. Auch hier prüften wir von überlebender Haut sowohl die oberflächlichen wie die tiefen Schichten, und in derselben Weise auch die Leichenhaut. Ein Versuch sei hier ausführlich wiedergegeben, von den anderen nur die Resultate mitgeteilt. Die im nachfolgenden Versuch verwandte überlebende Haut stammte von dem Bauchlappen eines Patienten, der wegen Gallenblasenempyem operiert wurde.

Tabelle II.

Anaerober Glykolyseversuch. Temperatur 37,5°.

Ablesung nach	Manometer	Versuch	Kontrolle
0′	15,0	20,0	20,1
15	15,05	22,2	20,2
30	15,1	24,3	20,3
45	15,0	26,4	20,4
60	14,9	28,7	20,6
1h 0′	15,0	20,0	20,1
15	15,0	22,2	20,2
30	15,1	24,1	20,1
45	14,9	25,9	20,05
2h	14,8	28,0	20,3

Schnittgewichte: A = 8,2 mg, B = 8,7 mg. Schnittdicke etwa 0,17 mm. $Q^{N_2}_{CO_2} = +11{,}6$.

Nachfolgend teilen wir die gesamten Resultate unserer Versuche zur Bestimmung der anaeroben Glykolyse mit, ausgedrückt durch

$$Q^{N_2}_{CO_2} = \frac{\text{cmm gebildete } CO_2}{\text{Stunde . mg Gewicht}}.$$

1. Überlebende Haut.

a) Oberflächliche Schicht: $Q^{N_2}_{CO_2} = +5{,}8, +11{,}6, +3{,}5, +3{,}55$. Durchschnitt: + 6,0.

b) Tiefere Schicht: $Q^{N_2}_{CO_2}$ stets sehr klein.

2. Leichenhaut.

a) Oberflächliche Schicht: $Q^{N_2}_{CO_2} = +2{,}33, +1{,}4, +5{,}8, +5{,}9, +1{,}6$. Durchschnitt: + 3,4.

b) Tiefere Schicht: $Q^{N_2}_{CO_2}$ = sehr klein, + 1,5, + 1,0, + 1,3, + 1,3, + 0,9, sehr klein. Durchschnitt: + 0,9.

Die Werte für die oberflächliche Schicht der überlebenden Haut sind demnach höher als für die der Leichenhaut. In tieferer Schicht scheint die Leichenhaut etwas stärker zu glykolysieren als die lebens-

frische Haut. Doch gilt im allgemeinen für die tieferen Schichten bezüglich der Glykolyse dasselbe wie bezüglich der Atmung.

Beim Vergleich dieser Werte mit den Glykolysewerten von Meerschweinchenhaut (s. unten) ergibt sich auch für die Glykolyse eine stärkere Wirkung der tierischen Haut. Denn der Durchschnittswert für diese, berechnet aus 14 Versuchen, beträgt $Q_{CO_2}^{N_2} = + 7{,}2$. Von menschlichen Organen ist bisher auch nur für Lymphdrüse und Rachenmandel der betreffende Wert ermittelt, er beträgt + 4,7 bzw. + 12,8 (*Warburg, Posener, Negelein*, l. c.). Der Wert für menschliche Haut liegt somit zwischen beiden.

Auch die *aerobe Glykolyse* haben wir in der Hautzelle studiert. Leider verliefen die Versuche nicht mit der gewünschten Regelmäßigkeit und gaben oft sehr schlechte Manometerausschläge. Den Grund hierfür haben wir leider nicht feststellen können. Im allgemeinen aber erhielten wir für $Q_{CO_2}^{O_2}$ nur kleine Werte.

Es fragt sich nun, wie fügen sich die Hautzellen in das von *Warburg* aufgestellte Zellsystem. Nach *Warburg* liefern Zellen, die sich in lebhafter Proliferation befinden, anaerobe Glykolysewerte, welche die Atmungswerte um ein Vielfaches übertreffen. Vergleicht man bei diesen Geweben die Glykolysewerte in Gegenwart von Sauerstoff mit den Atmungswerten, so ist der Quotient $\frac{Q_{CO_2}^{O_2}}{Q_{O_2}}$ fast $= 0$. Im Gegensatz dazu liefern bösartige Geschwülste einen Quotientenwert um 3 herum. Hiernach und nach unseren Befunden fügen sich die Zellen der Haut, entsprechend ihren physiologischen Funktionen, zwanglos in den Rahmen der gutartig proliferierenden Gewebe.

Von den hier mitgeteilten Zahlen seien wegen ihres besonderen Interesses die Glykolysewerte herausgehoben, die wir bei der Untersuchung von Diabetikern erhielten. $Q_{CO_2}^{N_2}$ an überlebender Haut $= + 3{,}5$, an Leichenhaut + 1,6. Diese Werte liegen an der unteren Grenze der Normalwerte. Es scheint demnach, daß trotz der großen Störung im Gesamtstoffwechsel die Haut des Diabetikers bezüglich ihrer glykolytischen Kraft nichts einbüßt. Wir sind damit beschäftigt, diese Frage und gleichzeitig die Atmung an einem größeren Material weiter zu verfolgen.

II.

Mit der zahlenmäßigen Feststellung der Größe von Atmung und Glykolyse der Hautzelle war eine sichere Grundlage geschaffen für die weitere Erforschung physiologischer Stoffwechselvorgänge in der Haut. Von diesen interessierte uns zunächst, wie die Hautzelle auf Impulse antwortet, die ihr aus verschiedenen Körperregionen mit dem Blute zuströmen. Es ist eine bekannte Tatsache, daß von ganz be-

stimmten Organen bestimmte Inkrete in das Blut abgegeben werden und diese in ganz entfernt liegenden Bezirken ihre Wirkung entfalten können. Es war deshalb verlockend zu untersuchen, ob und welche von diesen Inkreten befähigt sind, einen Einfluß auch auf den physiologischen Ablauf von Atmung und Glykolyse in der Haut auszuüben.

Die Versuchsanordnung war hiernach gegeben.

Wir gingen dabei so vor, daß wir den Manometertrog I als Thermomanometer laufen ließen, Manometertrog II und III mit zwei möglichst gleichen Gewebsschnitten beschickten, Trog II mit gewöhnlichem Ringer bzw. Glykolyse-Ringer, Trog III mit gleicher Menge Inkret-Ringergemisch versetzten. Die H-Ionenkonzentration war in beiden Gefäßen stets gleich, mit Ausnahme der Adrenalinversuche, auf die wir weiter unten eingehen werden. Als Inkrete verwandten wir Handelspräparate, deren Zusammensetzung relativ konstant und bekannt ist. Die erforderlichen Leerversuche sind jedesmal angestellt worden. Zu den folgenden Versuchen verwandten wir nur überlebende Haut. Wegen der Beschaffungsschwierigkeit von frischer menschlicher Haut benutzten wir die Bauchhaut von Meerschweinchen und stellten nur Kontrollversuche mit überlebender Menschenhaut an, wenn uns solche gerade zur Verfügung stand.

1. Versuche mit Ovoglandol.

Von der wirksamen Substanz der Ovarien ist bekannt, daß sie den Sauerstoffverbrauch des Gesamtorganismus steigert. Hiernach durfte man, wenn überhaupt eine Beeinflussung des Hautstoffwechsels durch dieses Hormon sich bemerkbar machen sollte, auch für die Hautzelle einen vermehrten Sauerstoffverbrauch erwarten. In der Tat ergaben unsere Versuche eine Beschleunigung des Atmungsprozesses um mehr als das Doppelte.

Tabelle III.

Verdünnung 1 : 10[1]).

Versuch	Q_{O_2}		Differenz
	Kontrolle	Versuch	Proz.
I	— 2,3	— 5,3	230
II	— 3,7	— 6,7	180
III	— 2,2	— 5,8	260
IV	— 1,3	— 2,7	210
Durchschn.	— 2,4	— 5,1	220

Sämtliche Versuche ergaben übereinstimmend eine enorme Steigerung der Atmung unter dem Einfluß des Inkretes. Anders dagegen fielen die Versuche mit anaerober Glykolyse aus.

[1]) Von der angegebenen Verdünnung wurden hier und in allen folgenden Versuchen stets 3 ccm verwandt.

Tabelle IV.

Versuch	$Q^{N_2}_{CO_2}$		Differenz
	Kontrolle	Versuch	Proz.
I	+ 14,0	+ 13,0	95
II	+ 4,7	+ 5,4	115
Durchschn.	+ 9,4	+ 9,2	105

Demnach erfährt die anaerobe Glykolyse keinerlei Beeinflussung durch Ovoglandol.

2. *Versuche mit Hypophysin.*

Vom Hypophysin kennt man eine Wirkung auf den Blutdruck, auf die Atmung, auf die glatte Muskulatur des Uterus und auf die Nierensekretion, keine dagegen, die in irgend einer Beziehung zum Chemismus der Zelle steht. Die Versuchsanordnung war hier die gleiche wie vorhin.

Tabelle V.

Verdünnung 1 : 10.

Versuch	Q_{O_2}		Differenz
	Kontrolle	Versuch	Proz.
I	— 2,7	— 1,1	40
II	— 3,1	sehr klein (ca. 0,3)	~ 10
III	— 4,8	— 1,5	30
Durchschn.	— 3,5	— 1,0	30

Tabelle VI.

Versuch	$Q^{N_2}_{CO_2}$		Differenz
	Kontrolle	Versuch	Proz.
I	+ 13,8	+ 8,0	60
II	+ 5,1	+ 4,4	85
Durchschn.	+ 9,5	+ 6,2	70

Hypophysin übt also einen stoffwechselverlangsamenden Einfluß aus: sehr stark wird die Atmung, in geringem Grade auch die Glykolyse gehemmt.

3. *Versuche mit Thyreoglandol.*

Das Thyreoglandol bewirkt bekanntlich eine mächtige Steigerung des Stoffwechsels. Dementsprechend fanden wir unter dem Einfluß dieses Hormons eine enorme Vermehrung des Sauerstoffverbrauchs.

Tabelle VII.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	Q_{O_2}		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	1 : 10	— 1,9	— 1,6	—
II	1 : 50*)	— 0,4	— 1,0	250
III	1 : 50	— 1,2	— 5,8	480
IV	1 : 50	— 2,1	— 3,8	180
Durchschnitt .	1 : 50	— 1,2	— 3,5	300

*) Schnitt etwas dick.

Tabelle VIII.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	$Q^{N_2}_{CO_2}$		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	1 : 10	+ 1,85	+ 1,4	—
II	1 : 20	+ 2,0	+ 0,8	40
III	1 : 20	+ 3,1	+ 1,3	40
Durchschnitt .	1 : 20	+ 2,6	+ 1,1	40

Sowohl bei der Atmung wie bei der Glykolyse sehen wir ein Ausbleiben der Wirkung im Versuch 1. Offenbar war hier die Hormonmenge zu groß gewählt. In allen anderen Versuchen sind dagegen die Resultate ganz eindeutig: enorme Steigerung der Atmung, starke Herabsetzung der Glykolyse. Thyreoglandol verhält sich also bezüglich der Atmung wie das Ovoglandol, doch ist hier die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs noch viel größer.

4. Versuche mit Testiglandol.

In seiner Wirkung auf den Stoffwechsel ähnelt das Testiglandol der Ovarialsubstanz; doch ist seine Wirkung wesentlich schwächer. Dementsprechend finden wir auch hier eine Steigerung der Atmung, die hinter der des Ovoglandols zurückbleibt. Außerdem ergab sich eine Herabsetzung der Glykolyse.

Tabelle IX.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	Q_{O_2}		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	1 : 20	— 1,3	— 2,5	190
II	1 : 10	— 1,7	— 1,2	—
III	1 : 20	— 2,1	— 3,2	150
Durchschnitt .	1 : 20	— 1,7	— 2,9	170

Tabelle X.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	$Q^{N_2}_{CO_2}$		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	1 : 10	+ 2,6	+ 3,1	120
II	1 : 20	+ 8,9	+ 4,2	50
III	1 : 20	+ 6,4	+ 4,9	75
Differenz . . .	1 : 20	+ 7,7	+ 4,6	60

Versuch 2 der Atmung und Versuch 1 der Glykolyse gaben von den anderen abweichende Werte; wahrscheinlich, weil zu beiden Versuchen die zugesetzte Hormonmenge zu groß war. Dafür lassen die anderen Versuche deutlich erkennen, daß das Testiglandol — wenn auch schwächer — ganz ähnlich dem Thyreoglandol wirkt, nämlich die Atmung steigert, die Glykolyse herabsetzt.

5. Versuche mit Insulin.

Vom Insulin ist bekannt, daß es unter bestimmten Bedingungen die Glykogensynthese begünstigt, und daß es den oxydativen Zuckerabbau beträchtlich fördern kann, je nach dem Organ, auf das es einwirkt. So ist seine Wirkung auf die Acetaldehydbildung der Leber wesentlich stärker als auf die der Haut. Ob Insulin auch den anaeroben Zuckerabbau beeinflussen kann, darüber ist bisher noch nichts bekannt.

Zunächst studierten wir den Einfluß des Insulins auf die Atmung und erhielten folgende Resultate:

Tabelle XI.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	Q_{O_2}		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	0,1 : 600	— 3,1	— 1,6	50
II	0,1 : 1500	— 7,8	— 6,6	85
III	0,1 : 300	— 3,4	— 2,1	60
IV	0,1 : 600	— 6,4	— 2,6	40
V	0,1 : 30	— 4,6	— 3,4	75
Durchschnitt .	—	— 5,1	— 3,3	65

In allen Versuchen kann man eine deutliche Abschwächung der Atmung konstatieren. Am wirksamsten erwies sich das Insulin bei einer Verdünnung von 1 : 600.

Die Glykolyseversuche hatten folgendes Ergebnis:

Tabelle XII.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	$Q^{N_2}_{CO_2}$		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	0,1 : 100	+ 5,1	+ 4,8	90
II	0,1 : 100	+ 7,0	+ 8,6	120
III	0,1 : 500	+ 10,0	+ 9,1	90
Durchschnitt .	—	+ 7,4	+ 7,5	100

Die anaerobe Glykolyse erfährt somit keine Beeinflussung durch Insulin. In einem Versuch, der hier nicht angeführt ist, da er einen nicht ganz regelmäßigen Verlauf nahm, beobachteten wir allerdings eine Steigerung, doch betrachten wir dieses Ergebnis nur als eine Ausnahme[1]).

6. *Versuche mit Adrenalin.*

Vom Adrenalin ist außer seiner Wirkung auf das Gefäßsystem bekannt, daß es Glykogen in den Organen mobilisiert und so eine vorübergehende Erhöhung des Blutzuckers und eine Zuckerausscheidung durch den Harn herbeiführt. Hiernach erwarteten wir von dem Adrenalin besonders interessante Aufschlüsse über seinen Einfluß speziell auf die Glykolyse der Haut. Leider stellten sich aber unseren Versuchen große Schwierigkeiten in den Weg.

Während die meisten Inkrete verhältnismäßig stabile Körper sind, wissen wir vom Adrenalin, daß es äußerst labil ist. Das trat in unseren Versuchen ganz augenfällig in die Erscheinung; sobald wir nämlich die salzsaure Lösung von Suprarenin mit Ringerlösung verdünnten, begann sie schon nach wenigen Minuten sich rötlich zu verfärben und zeigte nach Verlauf von einer Stunde ein deutlich rote Farbe. Die schnelle Zersetzlichkeit des Adrenalins machte sich nun bei unseren Versuchen sehr unangenehm bemerkbar. Wenn man nämlich eine mit Adrenalin versetzte Ringerlösung allein in der *Warburg*schen Apparatur beobachtet, so sieht man sofort einen starken Sauerstoffverbrauch, der allerdings mit fortschreitender Zeit kleiner wird, und nach Verlauf von etwa 2 Stunden gleich Null ist. Ein solcher Leerversuch nahm für gewöhnlich folgenden Verlauf:

Tabelle XIII.

Abgelesen nach	Adrenalin-Ringer 1 : 10		Ringerkontrolle
	I	II	
0′	15,0	20,0	20,0
30	12,0	16,8	19,9
60	8,9	14,6	19,9
90	7,9	13,9	19,9
120	7,1	13,4	20,0
150	7,1	13,3	19,9
180	7,1	13,4	20,0

Deshalb berücksichtigten wir bei unseren Atmungsversuchen mit Haut nicht die in den ersten 2 Stunden eintretenden Manometeränderungen, sondern benutzten für unsere Berechnung nur die in der dritten bzw. vierten Stunde beobachteten Werte, von der Annahme aus-

[1]) *Nachtrag bei der Korrektur.* In einer vor kurzem erschienenen Arbeit (diese Zeitschr. **171**, 381, 1926) erwähnen *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* anhangsweise (s. S. 397), daß Insulin keine Änderung des Stoffwechsels der grauen Hirnsubstanz in Ringerlösung bedingt, in Serum öfters, aber nicht immer, die Atmung ein wenig erhöht.

gehend, daß dann schon die Eigenoxydation des Adrenalins beendet war. — Noch ein zweites Moment machte sich bei diesen Versuchen anfänglich störend bemerkbar, nämlich die stark saure Beschaffenheit der im Handel befindlichen Präparate. Allerdings arbeiteten wir meist mit sehr starken Verdünnungen, so daß dieser Fehler nicht sonderlich ins Gewicht fällt.

In Tabelle XIV teilen wir zwei Versuche mit starkem, zwei mit schwachem Adrenalingehalt mit. Als Ausgangslösung diente stets das käufliche Suprarenin-hydrochloricum 1 : 1000.

Tabelle XIV.

Versuch	Angewandte Inkretverdünnung	Q_{O_2}		Differenz
		Kontrolle	Versuch	Proz.
I	1,0 : 5,0	— 6,3	— 8,2	130
II	1,0 : 10,0	— 4,8	— 5,0	100
III	0,1 : 10,0	— 3,6	— 3,9	110
IV	0,1 : 100,0	— 1,8	— 2,2	120
Durchschnitt .	—	— 4,1	— 4,82	118

Nach diesen Versuchen bewirkt Adrenalin eine geringe Beschleunigung der Atmung der Haut. Da dieselbe selbst bei einer so starken Verdünnung des Adrenalins wie in Versuch IV (0,1 : 100,0) in die Erscheinung tritt, wo von einem eigenen Sauerstoffverbrauch des Adrenalins kaum noch gesprochen werden kann, möchten wir diesen Befund — allerdings aus den oben angeführten Gründen mit der nötigen Reserve — doch einige Bedeutung beimessen.

Eine einwandfreie Bestimmung der anaeroben Glykolyse in Gegenwart von Adrenalin ist uns in keinem Falle geglückt. Stets traten so unregelmäßige Manometerschwankungen auf — neben regellosem Anstieg plötzlich völliger Stillstand des Manometers —, daß wir zu keinen brauchbaren Resultaten gekommen sind und deshalb auf die Wiedergabe derselben verzichten.

Fassen wir unsere Resultate in bezug auf die übrigen Inkrete zusammen, so ergibt sich folgendes:

Tabelle XV.

Inkrete	Änderung der	
	Atmung	Glykolyse
durch Ovoglandol	um 220 Proz.	um 105 Proz.
„ Hypophysin	„ 30 „	„ 70 „
„ Thyreoglandol	„ 300 „	„ 40 „
„ Testiglandol	„ 170 „	„ 60 „
„ Insulin	„ 65 „	∼ 100 „

Hiernach haben einen verstärkenden Einfluß auf die Atmung der Haut gezeigt in erster Reihe Thyreoglandol, dann Ovoglandol

und Testiglandol, während Insulin und besonders Hypophysin die Atmung herabsetzen. Auf die anaerobe Glykolyse hat keines der untersuchten Inkrete verstärkend gewirkt, dagegen abschwächend am stärksten Thyreoglandol, dann Testiglandol und Hypophysin.

Bei diesen Untersuchungen haben wir die Erfahrung gemacht, daß es keineswegs gleichgültig ist, in welcher Konzentration ein Hormon zur Anwendung kommt. Wählt man die Menge zu groß, so kann entweder die charakteristische Wirkung vollkommen ausbleiben, oder es kann sogar der entgegengesetzte Effekt auftreten. Das geht unter anderem deutlich hervor aus Atmungsversuch I mit Thyreoglandol, in dem eine Hemmung resultiert, obwohl gerade dieses Hormon die Hautatmung enorm steigert, und Atmungsversuch II mit Testiglandol, wo auch statt der erwarteten Förderung eine beträchtliche Hemmung zu konstatieren ist. Offenbar liegen die Verhältnisse bei den Hormonen ähnlich wie bei den Fermentaktivatoren, von denen ja bekannt ist, daß sie im Überschuß, statt zu fördern, die Fermentwirkung stark hemmen können.

Abgesehen von der wichtigen Tatsache, daß die normale Hautzelle der Wirkung bestimmter Hormone unterliegt, erscheinen uns diese Untersuchungen auch in allgemeiner Beziehung recht interessant. Denn es ist hier an dem Beispiel der Hautzelle überhaupt zum erstenmal gezeigt worden, daß Hormone auf den physiologischen Stoffwechsel der normalen Zelle in ganz bestimmter Richtung wirken können. Bisher hatte man stets die Wirkung der Hormone studiert, entweder an dem Verhalten des Gesamtorganismus oder an der Erscheinung, die von ihnen an einem isolierten Organ ausgelöst wurden. Hier ist zum erstenmal der Versuch gemacht, den Einfluß der Hormone an der Zelle selbst unter Beobachtung zweier für ihren Fortbestand äußerst wichtiger und äußerst charakteristischer Faktoren, der Atmung und der Glykolyse, zu verfolgen. Mit dieser Versuchsanordnung ist die Möglichkeit gegeben, einer Frage näherzutreten, die schon lange die Physiologie beschäftigt, nämlich der Frage von der gegenseitigen Beeinflussung der innersekretorischen Organe untereinander. In ihren wichtigsten Punkten harrt sie bisher noch der Klärung. Vielleicht gelingt es, auf dem von uns eingeschlagenen Wege vorwärtszukommen, wenn man zunächst Atmung und Glykolyse eines Gewebes z. B. der Leber unter dem Einfluß jedes Hormones gesondert studiert und dann die kombinierte Wirkung von zwei oder mehr Hormonen verfolgt. Derartige Versuche sind bereits im Gange.

Zusammenfassung.

1. Atmung und Glykolyse der menschlichen Haut werden nach der Vorschrift von *Warburg* bestimmt.

2. Der Durchschnittswert für die Atmung frischer menschlicher Haut beträgt $Q_{O_2} = -2{,}1$, für die anaerobe Glykolyse $Q^{N_2}_{CO_2} = +6$. Die entsprechenden Werte für Leichenhaut sind $Q_{O_2} = -2{,}0$ und $Q^{N_2}_{CO_2} = +3{,}4$. Diese Werte beziehen sich nur auf die oberflächlichen Hautpartien; die tieferen Schichten liefern wegen ihres starken bindegewebigen Anteils wesentlich kleinere Werte. — Die aerobe Glykolyse der Haut ergab nur sehr kleine Werte.

3. Hiernach fügt sich die Haut zwanglos in das von *Warburg* aufgestellte System der gutartig proliferierenden Zellen.

4. Durch Hormone der verschiedensten Art werden sowohl Atmung wie Glykolyse der Haut in charakteristischer Weise beeinflußt.

Die Arbeit ist aus Mitteln bestritten, die wir dem Japanausschuß der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft zu verdanken haben.

Die Fermente der Haut. VI.

Von

J. Wohlgemuth.

Über das Verhalten der Lipase und über das Vorkommen von Phosphatase, Sulfatase und Carboxylase in der Haut.

Von

Yasuo Nakamura.

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

I. Lipase.

Wohlgemuth und *Yamasaki*[1]) haben festgestellt, daß sich in der Haut ein fettspaltendes Ferment findet, und daß diese Lipase gegenüber den sonst im tierischen Organismus vorkommenden insofern eine Sonderstellung einnimmt, als sie sowohl gegen Chinin wie gegen Atoxyl resistent ist. In dem Unterhautfettgewebe fanden sie gleichfalls eine Lipase, und auch diese zeigte Chinin- und Atoxylresistenz. Diese Übereinstimmung in dem Verhalten beider Lipasen Giften gegenüber legte den Gedanken nahe, daß vielleicht ein genetischer Zusammenhang bestünde zwischen der Haut und dem unter ihr liegenden Fett. Wenn das der Fall war, mußte an anderen Stellen des Körpers abgelagertes Fett eine andere Lipase enthalten. Es wurden deshalb die im Fett der Nierenkapsel und im Mesenterialfett sich findenden Lipasen auf Chinin- und Atoxylresistenz geprüft; aber auch sie zeigten das gleiche Verhalten wie die Lipase des Unterhautfettgewebes. Vielleicht beruht diese funktionelle Übereinstimmung zwischen Subcutis und den verschiedenen Fettgeweben auf deren gleichen embryonalen Ursprung; denn sie alle leiten sich her von dem Mesenchym der Keimanlage.

---

[1]) *Wohlgemuth* und *Yamasaki*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 25; diese Zeitschr. 147, 203, 1924.

Ich untersuchte nun, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration die Wirkung der menschlichen Hautlipase optimal ist.

Die bisher geprüften tierischen Lipasen zeigen hierin recht erhebliche Differenzen untereinander. So liegt das Optimum der Pankreaslipase und der Serumlipase nach *Davidsohn*[1]) bei $p_H = 8$, der Darmlipase bei $p_H = 8{,}5$, das der Magenlipase bei $p_H = 5{,}7$. Es war nun von Interesse festzustellen, welcher von den genannten Lipasen die der Haut bezüglich ihres Wirkungsoptimums am nächsten steht.

Die für diese Versuche erforderlichen Hautextrakte stellten wir uns so her, daß wir Haut von Leichen zunächst mit der Schere möglichst fein zerkleinerten und dann mit Glassplittern in der Reibschale unter Zusatz von 1proz. Kochsalzlösung gründlichst zerrieben, bis zu einem fast homogenen Brei. Das Verhältnis von Kochsalzlösung zur Substanz war stets 3 : 1. Dieser Brei blieb 24 Stunden im Eisschrank stehen, wurde am nächsten Tage abzentrifugiert und der überstehende Extrakt zum Versuch verwandt. Jeder Versuch setzte sich, soweit nicht anders angegeben ist, zusammen aus 4,0 ccm Hautextrakt, 1,0 ccm der jeweiligen Pufferlösung und 25 ccm gesättigter wässeriger Tributyrinlösung. Sämtliche Pufferlösungen wurden nach *Sörensen* bereitet.

Die Versuchsanordnung war so, daß nach dem Vorgang von *Ogawa*[2]) in einem mit doppeltdurchbohrten Stopfen verschlossenen kleinen Pulverglas, das in einem Wasserbade von 25° C stand, zunächst die Tributyrinlösung vorgewärmt, dann der Puffer und gleich darauf die Lipaselösung zugegeben wurde. Unmittelbar nach der Michung wurde durch die in der einen Durchbohrung des Stopfens befindliche Tropfpipette die notwendige Menge angesogen und die Tropfenzahl festgestellt. Die Tropfpipette selbst trug einen kurzen Gummischlauch, der mit einer Klemme verschlossen war und jedesmal beim Ansaugen und Zählen geöffnet wurde. In der zweiten Durchbohrung des Stopfens befand sich zur Herstellung der Kommunikation mit der Außenluft ein einfaches Glasrohr, um den Abfluß aus der Tropfpipette ungestört vor sich gehen zu lassen. Auf diese Weise waren Temperaturschwankungen durch die häufige Entnahme von Proben vermieden. Die Zählung wurde stets 1 Stunde lang durchgeführt und geschah immer in Intervallen von 10 Minuten. Auf diese Weise wurde zunächst das Wirkungsoptimum der Lipase der menschlichen Haut bestimmt.

Die Reaktion der in der oben beschriebenen Weise hergestellten Hautextrakte ist mannigfachen Schwankungen unterworfen; meist liegt sie bei $p_H = 7$, mitunter begegnet man aber auch Extrakten mit einer $p_H = 6{,}8$ bis 6,5. Wahrscheinlich beruht das auf der Bildung saurer Produkte in der Haut nach Eintritt des Todes infolge autolytischer Vorgänge in den absterbenden Zellen. Da nun diese Eigenreaktion des Extrakts je nach ihrer Abweichung von dem Neutralpunkt das zugesetzte Puffergemisch mehr oder weniger stark beeinflußt, so

[1]) *Davidsohn*, diese Zeitschr. 45, 284, 1912; 49, 249, 1913.
[2]) *J. Ogawa*, ebendaselbst 149, 216, 1924.

haben wir jedesmal bei Beginn und nach Beendigung des Versuchs die Reaktion gemessen; das geschah stets auf kolorimetrischem Wege.

Es wurde nun zunächst mit Phosphatpuffergemischen im Bereich von $p_H = 6{,}0$ bis 8,0 die Wirkung der verschiedenen H' an diversen Extrakten untersucht. In der folgenden Tabelle I führe ich eine solche Versuchsreihe an.

Tabelle I.

Versuch	Phosphatgemisch			p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
					0	10	20	30	40	50	60	
1	(Kontrolle)			7,0	136	133	127	124	120	116	114	7,0
2	Prim. Phosphat			6,1	136	134	131	128	125	123	122	6,1
3	Prim.	"	7,0	6,8	136	132	126	123	120	116	114	6,8
	Sek.	"	3,0									
4	Prim.	"	6,0	6,9	136	132	125	121	119	115	113	6,9
	Sek.	"	4,0									
5	Prim.	"	5,0	7,0	136	132	125	120	116	114	112	6,9
	Sek.	"	5,0									
6	Prim.	"	3,0	7,3	136	131	123	118	115	112	110	7,2
	Sek.	"	7,0									
7	Sek.	"		7,6	136	131	123	119	115	113	111	7,5
8	Sek.	"	10,0	7,7	135	132	125	120	116	114	112	7,6
	NaOH		1,0									
9	Sek.	"	10,0	7,8	135	131	125	120	116	114	113	7,7
	NaOH		2,0									
10	Sek.	"	10,0	8,0	135	132	128	126	124	121	118	7,9
	NaOH		3,0									

Wir sehen, daß im Bereich von $p_H = 6{,}9$ bis 7,8 die Spaltung eine bessere ist als ohne Zusatz eines Puffers; am besten ist sie bei $p_H = 7{,}3$. In anderen Fällen lag das Optimum der Wirkung etwas mehr nach der alkalischen Seite bei $p_H = 7{,}5$, in manchen wiederum dem Neutralpunkt näher bei $p_H = 7{,}1$, so daß man wohl sagen kann, daß das Optimum der Hautlipase im Bereich von $p_H = 7{,}1$ bis 7,5 gelegen ist. Sie zeigt somit keine Übereinstimmung mit einer der oben zitierten Lipasen; am nächsten käme sie noch der Serumlipase, für die *Rona*[1]) bisweilen als optimale Reaktion 7,0 fand.

Auch bei der Lipase aus den oberflächlichen Hautschichten fanden wir als optimale Reaktion $p_H = 7{,}0$ bis 7,5.

Im Anschluß hieran wurde untersucht, bei welcher Reaktion die Lipase des Unterhautfettgewebes ihre optimale Wirkung entfaltet. Die

[1]) *Rona*, diese Zeitschr. **33**, 413, 1911.

Extrakte wurden in der gleichen Weise wie bei der Haut gewonnen; sie reagierten indes meist weit saurer als die aus der Haut, für gewöhnlich schwankte die Reaktion zwischen $p_H = 6{,}0$ bis 6,3. Auch hier prüften wir zunächst mit Phosphatpuffern, bei welcher Reaktion optimale Wirkung erzielt wird, indem wir jedesmal zu Beginn und am Schluß des Versuchs die Reaktion kontrollierten. Aus meinen Protokollen sei ein solcher Versuch angeführt.

Tabelle II.

Versuch	Phosphatgemisch		p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
				0	10	20	30	40	50	60	
1	Ohne		6,4	131	120	115	112	110	108	106	6,4
2	Prim. Phosphat		5,8	131	120	115	110	106	104	103	5,8
3	Prim. „	9,0	6,1	131	115	106	102	100	99	98	6,1
	Sek. „	1,0									
4	Prim. „	8,5	6,2	131	114	104	100	98	97	97	6,1
	Sek. „	1,5									
5	Prim. „	8,0	6,4	131	112	101	98	97	96	96	6,4
	Sek. „	2,0									
6	Prim. „	7,0	6,6	131	112	101	99	98	98	97	6,5
	Sek. „	3,0									
7	Prim. „	5,0	6,9	131	110	100	99	98	97	96	6,8
	Sek. „	5,0									
8	Sek. „		7,5	130	104	98	97	96	96	95	7,4
9	Sek. „	10,0	7,6	131	105	100	98	97	96	96	7,5
	NaOH	1,0									
10	Sek. „	10,0	7,7	130	115	105	103	102	111	99	7,6
	NaOH	2,0									
11	Sek. „	10,0	7,9	130	119	110	105	102	101	100	7,8
	NaOH	3,0									

Auch hier liegt die optimale Wirkung bei $p_H = 7{,}5$, doch sehen wir, daß in einem weit größeren Reaktionsbereich als beim Hautextrakt ein nahezu optimaler Effekt erreicht wird. Der Grund hierfür ist vielleicht zu suchen in der Beobachtung, daß es für das Resultat keineswegs gleichgültig ist, welches Puffergemisch für die Herstellung einer bestimmten Reaktion verwandt wird, daß verschiedene Systeme trotz gleicher Reaktion einen ganz verschiedenen Effekt bedingen können.

So beobachteten wir zunächst einmal, daß, wenn wir den Extrakt z. B. aus Unterhautfettgewebe bei seiner ursprünglichen Reaktion untersuchten und in einem Parallelversuch ein Phosphatgemisch von der gleichen Reaktion dem Fermentsubstratgemisch zusetzten, ohne daß dadurch die $H^{\cdot}$-Konzentration irgendwie geändert wurde, in dieser Portion die Tributyrinspaltung eine wesentlich bessere war als in der

Kontrolle, obwohl auch am Schluß des Versuchs in beiden Portionen die gleiche Reaktion festgestellt wurde. Als Beleg führe ich je zwei Parallelversuche an.

Tabelle III.

Versuch	Phosphatgemisch	p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
			0	10	20	30	40	50	60	
1a	Ohne	6,4	131	120	115	112	110	108	106	6,4
1b	Prim. Phosphat 8,0 Sek. „ 2,0	6,4	131	112	101	98	97	96	96	6,4
2a	Ohne	6,3	130	123	116	112	110	108	107	6,2
2b	Prim. Phosphat 8,0 Sek. „ 2,0	6,3	130	109	96	92	91	90	90	6,3

Aus beiden Versuchen ersehen wir, daß die Gegenwart von Phosphationen tatsächlich eine ganz bedeutende Verstärkung der Lipasewirkung bedingt. Wir möchten daraus schließen, daß das Phosphation eine aktivierende Wirkung auf die Lipase hat. Allerdings müssen wir einschränkend bemerken, daß uns diese Feststellung nur an der Lipase aus Unterhautfettgewebe und aus Mesenterialfett gelang, nicht dagegen an der Hautlipase. Vermutlich liegt das daran, daß die Extrakte aus der Haut an sich schon so viel Phosphat enthalten, daß ein weiterer Zusatz die Bedingungen für die Lipasewirkung nicht mehr zu verbessern imstande ist.

Mit diesem Befund wird nun auch klar, weshalb bei dem Lipaseextrakt aus Unterhautfettgewebe in einem viel weiteren Reaktionsbereich ein nahezu optimaler Effekt erzielt wurde als bei dem Hautextrakt; offenbar deshalb, weil hier — in dem an sich phosphatarmen Extrakt — die Phosphationen ihren aktivierenden Einfluß besonders deutlich in die Erscheinung treten lassen konnten.

In dieser aktivierenden Wirkung der Phosphationen auf die Lipase sehen wir ein Analogon zu der von *Wohlgemuth*[1]) festgestellten aktivierenden Wirkung des Chlorions auf die Diastase.

Wir haben nun weiter untersucht, wie Puffergemische anderer Zusammensetzung, z. B. aus Glykokoll, Borat und Citrat, im Vergleich zu Phosphat auf die Lipase der Haut wirken. Vorausgeschickt sei, daß *Ogawa* bei der Untersuchung der Lipase aus Takadiastase[2]) festgestellt

[1]) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 10, 1908.

[2]) Zu der Fußnote in der Arbeit von *Ogawa*, l. c. S. 216, in der mitgeteilt wird, daß im Laboratorium von Prof. *Michaelis* in Berlin das Vorhandensein eines fettspaltenden Ferments in der Takadiastase festgestellt worden ist, sei bemerkt, daß ich schon lange vorher in der Takadiastase unter anderen Fermenten auch eine Lipase gefunden und darüber in dieser Zeitschr. **89**, 336, 1912 ausführlich berichtet habe. *Wohlgemuth.*

hat, daß Borat die Lipase hemmt, Glykokoll aber ohne Einfluß auf das Ferment ist, bei der Magenlipase dagegen die Hemmung nur in ganz geringem Maße zum Ausdruck kommt.

Wir führten diese Versuche sowohl mit Extrakten aus der Haut wie aus dem Unterhautfettgewebe aus. Eine große Schwierigkeit war indes bei diesen Versuchen zu überwinden, nämlich die Reaktion mit allen Puffern so einzustellen, daß sie in allen Vergleichsportionen auch die gleiche war. Durch ständiges Variieren der Mengenverhältnisse gelang das schließlich in zufriedenstellender Weise. Die Wirkungen der vier Puffer wurden an der Hautlipase studiert bei $p_H = 7{,}5$, an der Unterhautfettgewebslipase bei $p_H = 7{,}0$. Das Resultat dieser Untersuchungen gebe ich in den Tabellen IV und V wieder.

Tabelle IV.

Versuch	Puffer	p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
			0	10	20	30	40	50	60	
1	Ohne	7,0	142	137	130	125	121	118	117	6,9
2	NaOH	7,5	142	137	131	125	122	119	118	7,4
3	Prim. Phosphat 1,0 Sek. „ 9,0	7,5	143	134	126	120	116	114	112	7,4
4	Borat 5,5 ClH 4,5	7,5	143	136	130	124	120	118	117	7,4
5	Glykokoll 9,0 NaOH 1,0	7,5	143	134	127	122	119	117	115	7,4
6	Citrat 3,0 NaOH 7,0	7,5	143	136	130	125	120	118	116	7,4

Tabelle V.

Versuch	Puffer	p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
			0	10	20	30	40	50	60	
1	Ohne	6,0	143	141	138	136	134	131	128	6,0
2	NaOH	7,0	143	140	135	131	128	127	126	6,9
3	Prim. Phosphat 5,0 Sek. „ 5,0	7,0	143	138	130	125	120	116	113	7,0
4	Glykokoll 9,5 NaOH 0,5	7,0	143	140	133	128	125	121	117	7,0
5	Borat 4,5 ClH 5,5	7,0	143	139	134	129	125	123	122	6,9
6	Citrat 2,5 NaOH 7,5	7,0	143	140	136	132	130	128	127	7,0

Aus beiden Versuchsreihen geht hervor, daß, wie nach den oben mitgeteilten Versuchen zu erwarten war, der Phosphatpuffer am günstigsten auf die Tributyrinspaltung wirkt. Dann folgt der Glykokollpuffer, der auch eine merkliche Beschleunigung bewirkt, während Citrat- und Boratpuffer auf die Hautlipase ohne Einfluß bleiben. Bei der Unterhautfettgewebslipase wirkt auch der Boratpuffer begünstigend auf die Tributyrinspaltung.

Bei der Beurteilung, ob ein Puffergemisch die Lipasewirkung begünstigt oder nicht, darf man nicht als Vergleichswert den Effekt aufstellen, den man mit Phosphatpuffer erzielt. Denn wir haben oben gezeigt (s. Tabelle III), daß das Phosphation als Aktivator gegenüber der Lipase zu gelten hat. Als Vergleichswert muß unseres Erachtens derjenige herangezogen werden, den man bekommt unter Verwendung eines indifferenten Reaktionsregulators wie n/10 NaOH (s. Tabelle V, Versuch 2 und Tabelle VI, Versuch 2). Mit diesem Werte verglichen, wirkt nicht nur der Phosphatpuffer aktivierend auf die Hautlipase, sondern auch der Glykokollpuffer, und bei der Lipase des Unterhautfettgewebes auch der Boratpuffer, während der Citratpuffer stets ohne Einfluß bleibt.

Schließlich wurde noch untersucht, einmal wie die Hautlipase sich verhält, wenn man etwaige störende Stoffe durch Dialyse entfernt, und ferner, ob ihre ursprüngliche Atoxyl- und Chininresistenz durch die Dialyse eine Änderung erfährt. Da für diese Versuche eine große Menge gut wirksamer Fermentlösung notwendig war, diese aber aus Hautmaterial nicht leicht beschafft werden konnte, stellten wir diese Versuche an einem aus Unterhautfettgewebe hergestellten Extrakt an, zumal die in ihm enthaltene Lipase den gleichen Charakter hat wie die Hautlipase. Von dem frisch hergestellten Extrakt wurde ein Teil zurückbehalten zu Kontrollversuchen, der andere in einem Pergamentschlauch unter Toluol der Dialyse gegen fließendes Wasser unterworfen und nun in Zwischenräumen von 2, 3 und 5 Tagen auf seinen Gehalt an Lipase und auf sein Verhalten gegenüber Chinin und Atoxyl geprüft. Das Ergebnis teile ich in Tabelle VI mit (s. nächste Seite).

Aus ihr geht zunächst hervor, daß nach zweitägiger Dialyse (Versuch 4) die Lipasewirkung eine geringe Zunahme erfährt, vielleicht infolge Entfernung störender saurer Produkte; denn wir sehen die Reaktion sich dem Neutralpunkt etwas nähern. Nach dreitägiger Dialyse (Versuch 7) ist der Wert wieder eine Spur schwächer, und nach 5 Tagen (Versuch 10) sehen wir eine beträchtliche Abnahme in der Wirkung. In der Kontrollportion (Versuch 13), die bei Zimmertemperatur gehalten wurde, war die Lipase ungeschwächt erhalten geblieben.

Gleichzeitig mit der Abnahme der Lipase bei der Dialyse hatte auch die Resistenz gegen Chinin, besonders aber gegen Atoxyl, stark

Tabelle VI.

Versuch		p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
			0	10	20	30	40	50	60	
1	Ohne Dialyse . . .	6,0	140	128	119	115	113	112	112	5,9
2	10 mg Atoxyl . . .	6,0	141	134	131	130	130	129	129	5,9
3	10 „ Chinin . . .	6,0	141	132	123	118	115	113	111	6,0
4	Dialyse (2 Tage) .	6,2	141	129	120	114	110	108	108	6,1
5	10 mg Atoxyl . . .	6,2	141	134	131	130	129	129	128	6,2
6	10 „ Chinin . . .	6,2	141	131	121	117	115	113	112	6,1
7	Dialyse (3 Tage) .	6,2	141	130	122	115	113	110	109	6,1
8	10 mg Atoxyl . . .	6,2	141	134	130	129	129	128	127	6,2
9	10 „ Chinin . . .	6,2	141	132	123	119	116	114	113	6,1
10	Dialyse (5 Tage) .	6,2	141	135	130	128	127	126	125	6,2
11	10 mg Atoxyl . . .	6,2	141	139	138	138	138	138	138	6,2
12	10 „ Chinin . . .	6,2	141	138	137	136	135	134	132	6,2
13	Kontrolle nach 5 Tagen; ohne Dialyse	6,0	141	130	120	114	113	112	112	5,9

gelitten. Während Chinin bei dem nativen Extrakt und bei dem 2 und 3 Tage dialysierten nicht die geringste Abschwächung bewirkte, sieht man eine solche deutlich nach fünftägiger Dialyse. Besonders stark aber ist sie hier nach Atoxyl, das nunmehr eine totale Hemmung bewirkt.

Hiernach hat es den Anschein, daß die Chinin- und Atoxylresistenz nicht eine Eigenschaft der Hautlipase selber ist, sondern zurückgeführt werden muß auf die Anwesenheit von dialysablen Begleitstoffen, die das Ferment vor dem schädlichen Einfluß der Gifte schützen. Wenn unsere Annahme richtig war, so mußte es gelingen, durch Zusatz von nicht dialysiertem Extrakt zum dialysierten die Chinin- und Atoxylresistenz wieder zum Vorschein zu bringen. Das ist in der Tat der Fall, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

Tabelle VII.

Versuch		p_H zu Beginn	Tropfenzahl nach Minuten							p_H zum Schluß
			0	10	20	30	40	50	60	
1	Dialys. Extrakt	6,2	141	135	130	128	127	126	125	6,2
2	+ 0,5 ccm Frischextrakt	6,2	141	136	131	129	127	125	124	6,1
3	+ 10 mg Atoxyl	6,2	141	139	138	138	138	138	138	6,2
4	+ 10 mg Chinin	6,2	141	138	137	136	135	134	132	6,2
5	+ 10 mg Atoxyl + 0,5 mg Frischextrakt	6,2	141	138	136	134	132	131	130	6,2
6	+ 10 mg Chinin + 0,5 mg Frischextrakt	6,2	141	137	133	130	128	125	123	6,1
7	Kontrolle mit 0,5 mg Frischextrakt allein	6,1	142	142	142	142	142	141	141	6,1

Das frische Extrakt stellten wir uns aus stark zerkleinerter menschlicher Haut her, die im Verhältnis von 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung gründlichst zerrieben wurde, 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehenblieb und dann zentrifugiert wurde. Von diesem Extrakt setzten wir zu jedem Versuch 0,5 ccm zu, ein Quantum, das an sich nicht die geringste Tributyrinspaltung bedingte (Versuch 7). Auch bei Zusatz dieses Quantums zum dialysierten Extrakt trat keine nennenswerte Änderung in der Spaltung ein (Versuch 2). Dagegen war dieses Extrakt imstande, die schwach hemmende Wirkung des Chinins und die stark hemmende des Atoxyls in einem solchen Umfang zu paralysieren, daß die Atoxylempfindlichkeit vollkommen aufgehoben war, und daß das Chinin nunmehr eine minimale hemmende Wirkung entfaltete (vgl. Tabelle VII, Versuch 1, 2, 3).

Damit ist bewiesen, daß die Chinin- und Atoxylresistenz nicht auf einer Eigenschaft der Hautlipase selbst beruhen, sondern auf der Anwesenheit von Begleitstoffen, welche die hemmende Wirkung der Gifte paralysieren. Von diesen Begleitstoffen befreit, zeigte die Hautlipase eine ausgesprochene Atoxylempfindlichkeit und nimmt so denselben Charakter an, wie ihn die Leberlipase besitzt.

Schon *Willstätter* und *Memmen*[1]) haben gezeigt, daß bei Lipasen, die bezüglich ihres Wirkungsoptimums grundverschieden zu sein scheinen, diese Differenz sich vollkommen ausgleichen läßt, wenn man bei ihrer Darstellung dafür sorgt, daß sie möglichst frei von Begleitstoffen sind. So haben sie festgestellt, daß die Magenlipase, die ihr Optimum gewöhnlich bei saurer Reaktion zeigt, in bestimmter Weise aus Magenschleimhaut gewonnen (Adsorption mit Tonerde, Elution mit glycerinhaltigem alkalischen Phosphat), nunmehr bei der gleichen alkalischen Reaktion ihr Optimum besitzt wie die Pankreaslipase. Bei unseren Versuchen bewirkte schon Dialyse allein eine Änderung des Charakters der Hautlipase. Wir möchten indes nicht glauben, daß damit schon der wahre Charakter dieser Lipase festgestellt ist. Wahrscheinlich sind außer den dialysablen noch andere Begleitstoffe vorhanden, deren Beseitigung erst die wahren Eigenschaften der Hautlipase wird erkennen lassen. Das zu entscheiden, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

II. Phosphatase.

Nachdem das Vorkommen einer esterartigen Verbindung von Hexose und Phosphorsäure (Lactacidogen) speziell in der Muskulatur durch die wichtigen Untersuchungen von *Embden*[2]) und seinen Mit-

[1]) *R. Willstätter* und *F. Memmen*, H. **133**, 247, 1924.
[2]) *Embden, Grießbach* und *Schmitz*, H. **93**, 1 ; **124**, 1914/15.

arbeitern sichergestellt und von ihnen ferner gezeigt worden war, daß die Muskulatur auch die Fähigkeit besitzt, die organisch gebundene Phosphorsäure auf fermentativem Wege in Freiheit zu setzen, lag es nahe, auch in anderen Organen nach einer solchen Phosphatase zu fahnden.

Schon lange vorher hatten *Harden* und *Young*[1]) in der Hefe ein Ferment feststellen können, das das von der Hefe gebildete Zymophosphat in seine beiden Bestandteile zerlegt, und ebenso hatten *Neuberg* und *Karczag*[2]) in den Saccharomyceten eine Glycerophosphatase aufgefunden, welche glycerinphosphorsaure Salze zerlegt. In der Folge ist dann konstatiert worden, daß die Phosphatase sowohl in den Samenorganismen wie in fast sämtlich untersuchten Vegetabilien ein weit verbreitetes Ferment ist [*Nemec* und *Duchon*[3])]. — Über tierische Phosphatasen sind wir, wenn wir von den bereits zitierten Beobachtungen am Muskel durch *Embden* absehen, in letzter Zeit unterrichtet durch die eingehenden Untersuchungen von *Tomita*[4]). Er fand, daß die Phosphatase im tierischen Organismus weit verbreitet ist und in besonders großer Menge angetroffen wird in Niere, Leber und Milz, und zwar werden von ihnen sowohl saccharose- wie hexosephosphorsaure Salze von den einzelnen Organen gespalten.

Es war nun von Interesse, festzustellen, ob auch die Haut eine Phosphatase enthält.

Über Versuche, mittels Hautextrakt Phosphor aus N-haltigen Verbindungen abzuspalten, haben bereits *Wohlgemuth* und *Klopstock*[5]) berichtet. Sie fanden, daß die Haut besonders der Achselhöhle und der Fußsohle befähigt ist, aus Hefenucleinsäure und Thymusnucleinsäure Phosphor abzuspalten.

Zu meinen Versuchen verwandte ich menschliche Haut vom Oberschenkel und Unterhautfettgewebe sowie Haut von Meerschweinchen. Das Material wurde gründlichst zerkleinert und in der oben beschriebenen Weise ein Extrakt hergestellt; bei dieser Art der Verarbeitung erhielt ich stets die dem Gewicht der Haut entsprechende doppelte Menge Extrakt. Als Substrat verwandte ich saccharosephosphorsaures Natrium in 10proz. Lösung. 10 ccm hiervon wurden mit 20 bis 50 ccm Extrakt und einer ausreichenden Menge Toluol 6 Tage unter öfterem Umschütteln im Brutschrank gehalten, nach Ablauf der Frist scharf zentrifugiert, von dem Bodensatz abgegossen und die in Lösung gegangene freie Phosphorsäure durch Zusatz von 10 ccm Magnesiamischung niedergeschlagen. In der gleichen Weise wurde mit der Kontrolle verfahren, die aus der gleichen Menge Hautextrakt + 10 ccm Wasser bestand. Eine zweite Kontrolle mit Natrium-saccharo-phosphat allein anzusetzen, erübrigte sich, da wir uns überzeugt hatten, daß in physiologischer Kochsalzlösung eine spontane Hydrolyse nicht eintrat. Um die Abscheidung des Ammonium-Magnesiumphosphats nicht zu stören, blieb die Fällung bis zum nächsten Tage im Eisschrank; dann wurde der Nieder-

---

[1]) *Harden* und *Young*, Proc. Chem. Soc. **21**, 189, 1905.
[2]) *Neuberg* und *Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 60, 1911.
[3]) *Nemec* und *Duchon*, ebendaselbst **119**, 74, 1921.
[4]) *Tomita*, ebendaselbst **181**, 161, 1922.
[5]) *Wohlgemuth* und *Klopstock*, ebendaselbst **153**, 487, 1924.

schlag durch scharfes Zentrifugieren von der Flüssigkeit abgetrennt, viermal mit destilliertem Wasser gewaschen, quantitativ in einen Meßkolben von 25 ccm übertragen, in 5 ccm 2proz. Trichloressigsäure gelöst, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und im Filtrat kolorimetrisch der Phosphor nach *Bell-Doisy* bestimmt. Die Verarbeitung der Kontrolle geschah in der gleichen Weise.

Das menschliche Material stammte von Leichen, die Meerschweinchenhaut von Tieren, die unmittelbar vorher durch Entbluten getötet waren. Das Resultat dieser Untersuchungen ergibt sich aus Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Versuch		Extrakt aus	Abgespaltene P_2O_5-Menge		Abgespaltene P_2O_5-Menge in mg auf 100 g Haut berechnet	
			Versuch mg	Kontrolle mg	Versuch	Kontrolle
1	Mensch	16 g Haut	2,63	0,035	16,45	0,22
2	„	15 g „	2,34	0,05	15,56	0,31
3	„	35 g Unterhautfettgewebe	2,02	0,1	5,77	0,28
4	„	30 g Unterhautfettgewebe	1,21	0,08	4,03	0,26
5	Meerschweinchen	10 g Haut	4,1	0,05	40,95	0,47
6	„	12 g Haut	6,58	0,06	54,81	0,49

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Haut eine nicht unbeträchtliche Menge an Saccharo-phosphatase enthält. Am wirksamsten erwies sich die Haut des Meerschweinchens, vermutlich deshalb, weil sie unmittelbar nach Eintritt des Todes zur Verwendung kam, während die menschliche Haut und das Unterhautfettgewebe erst 24 Stunden nach Eintritt des Todes verarbeitet wurden. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß die Meerschweinchenhaut reicher an Phosphatase ist als die menschliche. Denn in früheren Versuchen war von *Wohlgemuth* und *Sugihara*[1]) festgestellt worden, daß der Diastasegehalt der Meerschweinchenhaut den der Menschenhaut um das 30- bis 40fache übertrifft. Im Unterhautfettgewebe findet sich gleichfalls Phosphatase. Verglichen mit den Resultaten, die *Tomita* für tierische Organe angibt, bleibt indes die Wirkung der Haut hinter der von Leber, Niere und Milz zurück.

III. Sulfatase.

Nach den Untersuchungen von *Neuberg* und *Simon*[2]) enthalten Leber, Niere, Gehirn und Muskel von Kaninchen und Meerschweinchen

[1]) *Wohlgemuth* und *Sugihara*, diese Zeitschr. **163**, 263, 1925.
[2]) *Neuberg* und *Simon*, ebendaselbst **156**, 365, 1925.

ein Ferment, das die Fähigkeit besitzt, Ätherschwefelsäuren in ihre Komponenten zu zerlegen nach der Gleichung $R.O.SO_3K + H_2O = ROH + KHSO_4$. Wegen dieser Wirkung nannte *Neuberg* dieses Enzym Sulfatase.

Es wurde von ihm[1]) zuerst in dem Pilze Aspergillus oryzae (Takadiastase) aufgefunden, obwohl die im Pflanzenreich beobachteten Schwefelsäureverbindungen einen ganz anderen Bau besitzen als die typischen aromatischen Ätherschwefelsäuren, deren Vorkommen ausschließlich auf den Tierkörper beschränkt ist. Bezüglich der tierischen Sulfatase wurde von ihm festgestellt, daß sie auf die Kaliumsalze der Phenolschwefelsäure, p-Kresolschwefelsäure und Indoxylschwefelsäure einwirkt. Später hat dann *Rosenfeld*[2]) gezeigt, daß auch beim Menschen in den verschiedensten Organen die Sulfatase anzutreffen ist, wie Niere, Gehirn, Leber, Nebenniere, Milz, Lunge, Muskel und Pankreas.

Wir untersuchten nun, ob auch die menschliche und tierische Haut befähigt ist, Ätherschwefelsäuren in der gleichen Weise zu zerlegen.

Daß die Haut am Schwefelstoffwechsel nicht unbeteiligt ist, war a priori schon daraus zu schließen, daß sie die Eigenschaft besitzt, Gebilde mit besonders hohem Schwefelgehalt zu produzieren, eine Eigentümlichkeit, die ihr eine Sonderstellung vor allen tierischen Organen verleiht. Denn die Bildung von Produkten mit so hohem Cystingehalt wie Nägel, Haare, keratinhaltige Substanzen ist ein ausschließliches Charakteristikum der Haut. Ob und inwieweit sie an der Cystinbildung selber beteiligt ist oder nur als Cystinspeicher zu gelten hat, entzieht sich einstweilen noch unserer Kenntnis. Im Hinblick darauf schien es jedenfalls interessant, festzustellen, ob die Haut die Fähigkeit besitzt, gepaarte Schwefelsäuren zu zerlegen.

Die Versuche wurden nicht mit Hautextrakt wie bei der Lipase und Phosphatase ausgeführt, sondern mit der Haut selber. Sie wurde möglichst fein zerkleinert, mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung unter Zuhilfenahme von Glassplittern gründlichst verrieben und dieser Brei für den Versuch verwandt. Als Substrat benutzten wir phenolätherschwefelsaures Kalium, das nach der Vorschrift von *Czapek* synthetisch dargestellt war. Der frisch bereitete Hautbrei wurde versetzt mit 100 ccm 1proz. Lösung von phenolätherschwefelsaurem Kalium, zur Verhütung von Fäulnis mit 2 bis 3 ccm Toluol und zur Aufrechterhaltung der neutralen Reaktion nach Vorschrift von *Neuberg* und *Simon* mit 5,0 g $CaCO_3$. Dieser Zusatz ist unbedingt erforderlich, um eine spontane Zersetzung des an sich recht labilen Äthersulfats zu verhüten. Unmittelbar nach der Vereinigung sämtlicher Bestandteile wurde ein aliquoter Teil zur Kontrolle ent-

[1]) *Neuberg* und *Kurono*, diese Zeitschr. 140, 295, 1923.
[2]) *Rosenfeld*, ebendaselbst 157, 434, 1925.

nommen, scharf zentrifugiert, 10,0 ccm der überstehenden Flüssigkeit in einem Meßkolben von 50 ccm Inhalt mit 10 ccm alkalischer Barytmischung ausgefällt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Nach 18stündigem Stehen wurde abfiltriert und in 40 ccm des Filtrats durch Kochen mit Salzsäure die in ihm enthaltene Menge gepaarter Schwefelsäure als Bariumsulfat quantitativ bestimmt. In der gleichen Weise wurde in Intervallen von einem und mehreren Tagen die noch vorhandene Ätherschwefelsäure ermittelt und aus ihr der zersetzte Anteil prozentual berechnet. Nachfolgend gebe ich drei Versuche mit menschlicher Haut und zwei Versuche mit Meerschweinchenhaut wieder.

Versuch 1.

25 g Haut aus dem Oberschenkel einer Leiche (Enterocolitis, 65 Jahre) + 100 ccm 1proz. phenolätherschwefelsaures Kalium + 5 g $CaCO_3$ + 2 ccm Toluol. Temperatur 37° C.

Nach	1 Tage	5,21 Proz.	Spaltung
,,	4 Tagen	9,07 ,,	,,
,,	7 ,,	9,84 ,,	,,
,,	14 ,,	10,88 ,,	,,

Versuch 2.

25 g Haut aus dem Oberschenkel einer Leiche (Apoplexie, 75 Jahre) + 100 ccm 1proz. phenolätherschwefelsaures Kalium + 10 g $CaCO_3$ + 2 ccm Toluol. Temperatur 37° C.

Nach	1 Tage	5,80 Proz.	Spaltung
,,	2 Tagen	6,69 ,,	,,
,,	7 ,,	8,03 ,,	,,
,,	12 ,,	14,91 ,,	,,

Versuch 3.

25 g Haut aus dem Oberschenkel einer Leiche (Cystitis, Prostatitis, 67 Jahre) + 90 ccm 1proz. phenolätherschwefelsaures Kalium + 10 g $CaCO_3$ + 2 ccm Toluol. Temperatur 37° C.

Nach	1 Tage	1,98 Proz.	Spaltung
,,	4 Tagen	3,08 ,,	,,
,,	7 ,,	11,43 ,,	,,
,,	11 ,,	13,84 ,,	,,
,,	14 ,,	14,1 ,,	,,

Versuch 4.

25 g Haut eines eben entbluteten Meerschweinchens + 100 ccm 1proz. phenolätherschwefelsaures Kalium + 10 g $CaCO_3$ + 2 ccm Toluol. Temperatur 37° C.

Nach	1 Tage	1,31 Proz.	Spaltung
,,	2 Tagen	2,82 ,,	,,
,,	4 ,,	4,33 ,,	,,
,,	7 ,,	8,84 ,,	,,
,,	11 ,,	11,68 ,,	,,

Versuch 5.

25 g Haut eines frisch getöteten Meerschweinchens; Zusammensetzung wie oben.

Nach 1 Tage	. . . . .	1,99 Proz. Spaltung
„ 4 Tagen	. . . . .	unverändert
„ 7 „	. . . . .	7,96 Proz. Spaltung
„ 11 „	. . . . .	10,35 „ „

Entsprechende Kontrollen ohne Ferment zeigten keine spontane Spaltung des Salzes.

Sämtliche Versuche lassen somit eine deutliche Spaltung der Ätherschwefelsäure erkennen. Die menschliche Haut scheint an Wirkung die des Meerschweinchens zu übertreffen. Verglichen mit den Beobachtungen von *Rosenfeld* (l. c.) an menschlichen Organen ergibt sich, daß die Haut in ihrem Gehalt an Sulfatase zwar hinter den wirksamsten Organen (Niere, Gehirn, Leber) zurückbleibt, dagegen viel kräftiger wirkt als Muskel, Lunge und Milz.

IV. Carboxylase.

Durch die Untersuchungen von *Neuberg* und seinen Mitarbeitern[1]) ist die wichtige Tatsache festgestellt worden, daß durch lebende Hefen sowie durch Mazerationssaft von Hefen die Brenztraubensäure leicht in Acetaldehyd und Kohlendioxyd gespalten wird nach der Formel

$$CH_3 . CO . COOH = CH_3 . CHO + CO_2.$$

Dieser Vorgang verläuft so glatt, daß, wenn man die Vergärung in Gegenwart sekundärer schwefligsaurer Salze vor sich gehen läßt (*Neubergs* Abfangverfahren), nahezu theoretische Mengen an Acetaldehyd aufgefunden werden. Das Ferment, welches diese carboxylatische Spaltung vollzieht, nannte *Neuberg* Carboxylase.

Außer in pflanzlichen Zellen ist dieses Ferment auch in tierischen Zellen anzutreffen. Einen Abbau der Brenztraubensäure durch tierische Gewebe hat *Tschernorutzky*[2]) am Muskel- und Leberbrei von Hund und Kaninchen dargetan und *Maeda*[3]) im hiesigen Laboratorium für die Placenta bewiesen. Kohlensäureentwicklung beobachteten *B.* und *H. v. Euler*[4]), sowie *Wieland*

---

[1]) *C. Neuberg* und *E. Faerber*, diese Zeitschr. 78, 238, 1916; *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst 89, 365, 1918; 106, 281, 1920; *C. Neuberg* und *A. v. May*, ebendaselbst 140, 299, 1923.

[2]) *M. Tschernorutzky*, ebendaselbst 43, 486, 1912.

[3]) *K. Maeda*, ebendaselbst 143, 347, 1923.

[4]) *B.* und *H. v. Euler*, H. 97, 311, 1916.

und *Rau*[1]), wenn sie Organbrei auf brenztraubensaures Natrium einwirken ließen, und den Übergang von Brenztraubensäure in Acetaldehyd stellte *A. Gottschalk*[2]) am Leberbrei, *R. Tateyama*[3]) am Placentabrei fest.

Wir haben nun untersucht, ob auch die Haut vom Menschen und von Tieren eine Carboxylase enthält. Nach den obigen Ausführungen kann man diese Frage so entscheiden, daß man entweder feststellt, ob zugesetzte Brenztraubensäure verschwindet, oder ob aus ihr Kohlensäure gebildet wird, oder ob intermediär Acetaldehyd entsteht. Da der direkte Nachweis des bei der carboxylatischen Spaltung entstehenden Aldehyds am ehesten einen Irrtum ausschließen ließ, wählten wir diesen Weg, zumal wir in dem schönen Abfangverfahren von *Neuberg* eine durchaus exakt arbeitende Methode besitzen.

Wir gingen dabei so vor, daß wir Haut vom Menschen (Leichen) bzw. von frisch getöteten Meerschweinchen in der oben beschriebenen Weise mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung zu einem möglichst homogenen Brei verarbeiteten, dazu 10 ccm m/1 Brenztraubensäurelösung und 10 ccm Essigsäure-Acetatpuffer ($p_H = 6{,}5$) zusetzten, ferner 100 ccm m/10 Na_2SO_3 und 2 bis 3 ccm Toluol und gut durchmischten. Dieses Gemisch blieb 2 bis 3 Tage im Brutschrank bei 37 C unter häufigem Umschütteln, wurde dann mit 20 ccm m/1 Na_2CO_3 und 30 ccm m/1 $BaCl_2$ versetzt und nach einigem Stehen durch ein Faltenfilter filtriert. Der auf diese Weise frei gewordene Acetaldehyd wurde durch Dampf in eine mit etwas Wasser beschickte Vorlage unter starker Kühlung übergetrieben und das Destillat zur Beseitigung etwa entstandener Schwefelwasserstoffspuren über Bleicarbonat redestilliert. Wenngleich wir bei unseren sämtlichen Versuchen niemals auch nur die geringsten Anzeichen von Fäulnis wahrnehmen konnten, haben wir diese zweite Destillation trotzdem in den meisten Fällen ausgeführt, um jeder Verwechslung mit H_2S zu begegnen. Denn wir haben den entstandenen Acetaldehyd in diesen Versuchen noch nicht quantitativ bestimmt, sondern uns mit der qualitativen Probe von *Rimini* auf Acetaldehyd (Blaufärbung bei Zusatz von Natriumnitroprussid + Piperidin) begnügt. Im ganzen teilen wir nur vier Versuche aus unseren Protokollen mit.

Versuch 1 (Mensch).

Hautbrei (aus 50 g Haut + 150 ccm physiologischer NaCl-Lösung) + 150 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 10 ccm m/1 Brenztraubensäurelösung + 10 ccm Acetatpuffer + 100 ccm m/10 Na_2SO_3-Lösung + 2 ccm

---

[1]) *H. Wieland* und *H. Rau*, Ann. **436**, 235, 1924.
[2]) *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 582, 1924.
[3]) *R. Tateyama*, ebendaselbst **163**, 292, 1925.

Toluol. Nach zweitägigem Aufenthalt im Brutschrank Zusatz von 20 ccm m/1 Na_2CO_3 + 30 ccm m/1 $BaCl_2$, Filtration, Destillation.

Rimini-Probe auf Acetaldehyd: stark positiv.

Versuch 2 (Mensch).

Hautbrei (aus 115 g Haut + 345 ccm physiologischer NaCl-Lösung) + 200 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 10 ccm m/1 Brenztraubensäurelösung + 10 ccm Acetatpuffer + 100 ccm m/10 Na_2SO_3-Lösung + 3 ccm Toluol. Nach zweitägigem Stehen im Brutschrank Zusatz von 20 ccm m/1 Na_2CO_3 + 30 ccm m/1 $BaCl_2$, Filtration, Destillation.

Probe auf Acetaldehyd: sehr stark positiv.

Versuch 3 (Meerschweinchen).

Hautbrei (aus 40 g Haut + 120 ccm physiologischer NaCl-Lösung) + 120 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 10 ccm m/1 Brenztraubensäurelösung + 10 ccm Acetatpuffer + 100 ccm m/10 Na_2CO_3 + 2 ccm Toluol. Nach dreitägigem Stehen im Brutschrank Zusatz von 20 ccm m/1 Na_2CO_3 + 30 ccm m/1 $BaCl_2$, Filtration, Destillation.

Probe auf Acetaldehyd: stark positiv.

Versuch 4 (Meerschweinchen).

Hautbrei (aus 58 g Haut + 170 ccm physiologischer NaCl-Lösung) + 250 ccm NaCl-Lösung + 10 ccm m/1 Brenztraubensäurelösung + 10 ccm Acetatpuffer + 100 ccm m/10 Na_2SO_3-Lösung + 2 ccm Toluol. Nach zweitägigem Stehen im Brutschrank Zusatz von 20 ccm m/1 Na_2CO_3 + 30 ccm m/1 $BaCl_2$, Filtration, Destillation.

Probe auf Acetaldehyd: stark positiv.

Sämtliche hier mitgeteilten Versuche haben somit übereinstimmend ergeben, daß auch die Haut vom Menschen und vom Meerschweinchen imstande ist, Brenztraubensäure zu Acetaldehyd abzubauen, also eine Carboxylase enthält. Wenngleich wir uns nur mit dem qualitativen Nachweis des Aldehyds begnügten, so glauben wir doch aus dem Ausfall der Reaktion schließen zu können, daß die Mengen an Carboxylase in der Haut nicht unbeträchtlich sind. Daß diese Annahme richtig ist, geht aus der inzwischen erschienenen Mitteilung[1]) hervor, die sich mit dem Zuckerabbau in der Haut beschäftigt. Wir glauben ferner, daß die Gegenwart dieses Ferments nicht beschränkt ist nur auf die Haut von Mensch und Meerschweinchen, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach in der Haut aller Tiere anzutreffen ist.

Zusammenfassung.

1. Das Wirkungsoptimum der Hautlipase liegt bei $p_H = 7{,}1$ bis $7{,}5$.
2. Das Phosphation wirkt aktivierend auf die Hautlipase.

[1]) *Wohlgemuth* und *Nakamura*, diese Zeitschr. **173**, 258, 1926.

3. Die Chinin- und Atoxylresistenz der Hautlipase beruht nicht auf einer spezifischen Eigenschaft des Ferments selber, sondern auf der Anwesenheit dialysabler Begleitstoffe.

4. In der Haut und im Unterhautfettgewebe findet sich eine Phosphatase.

5. Auch Sulfatase ist in der Haut vorhanden.

6. Desgleichen ist die Haut imstande, Brenztraubensäure zu Acetaldehyd abzubauen (Carboxylase).

Die Arbeit ist aus Mitteln bestritten, die wir dem Japanausschuß der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft zu verdanken haben.

Über den Zuckerabbau im Zentralnervensystem des Menschen.

Von

J. Wohlgemuth und **Y. Nakamura.**

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

Über den Kohlehydratstoffwechsel im Gehirn war bis vor kurzem noch nichts bekannt. Zwar wies die längst bekannte Tatsache von dem Vorkommen der Galaktose in den Zerebrosiden, deren Entdeckung wir *Thierfelder* verdanken, darauf hin, daß im Gehirn ein Kohlehydratumsatz besonderer Art vor sich gehen müsse. Aber spätere Untersuchungen (*Thudichum*) schienen dafür zu sprechen, daß, wenn ein Zuckerumsatz im Gehirn überhaupt stattfindet, dieser nur ein ganz unbedeutender sein könne.

Erst durch die interessanten Untersuchungen von *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*[1]) ist gezeigt worden, daß das Zentralnervensystem über einen sehr regen Kohlehydratstoffwechsel verfügt. Aus ihren Versuchen mit dem isolierten Rückenmark von Fröschen geht hervor, daß von der Nervensubstanz Zucker der verschiedensten Art umgesetzt werden können, daß bei Gegenwart von Sauerstoff das Organ in der Ruhe von seinem Zuckerbestand viel einbüßt, bei elektrischer Reizung die Abnahme eine viel geringere ist und bei Gegenwart von Insulin der Zuckerbestand sogar eine bedeutende Zunahme erfährt, die noch beträchtlich gesteigert werden kann durch gleichzeitige elektrische Reizung. In etwas anderem Sinne verliefen die Untersuchungen von *Asher* und *Takahashi*[2]) am Gehirn von Säugetieren (Ratten, Kaninchen). Zwar zeigte sich auch hier bei Gegenwart von Insulin eine erhöhte Resistenz des Gehirnglykogens im Vergleich zum Leber- und Muskelglykogen; wenn aber die Insulindosis so gesteigert wurde, daß die Tiere Krämpfe bekamen, so trat auch im Gehirn ein großer Kohlehydratschwund ein. — Einen weiteren sehr interessanten Einblick in den Kohlehydratstoffwechsel der Nervenzelle brachten die Untersuchungen von *Warburg*[3]) und seinen Mitarbeitern an der grauen Hirnrinde von Ratten.

---

[1]) *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, Zeitschr. f. phys. Chem. **100**, 185, 1917; **101**, 248, 1918; **108**, 27, 1919; diese Zeitschr. **159**, 351, 1925.

[2]) *L. Asher* und *K. Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 444, 1924.

[3]) *O. Warburg, R. Posener* und *E. Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 331, 1924.

Neben beträchtlicher Atmung konnte er in ihr eine glykolytische Wirksamkeit feststellen, die ebenso groß ist wie beim Embryo. Diesen sehr wichtigen Befund hat dann *R. O. Loebel*[1]) dahin erweitert, daß die Nervenzelle (Froschrückenmark, Gehirn der Ratte) imstande ist, außer den körpereigenen Kohlehydraten auch fremde Zucker zu glykolysieren.

Bekanntlich kann nun der Zuckerabbau in der Zelle zwei Wege einschlagen, je nachdem an dem Prozeß Sauerstoff beteiligt ist oder nicht. Der eine Weg endet in der Milchsäure und entspricht dem anaeroben Abbau — an diesem Vorgang ist vermutlich das von *Lépine* entdeckte glykolytische Ferment beteiligt —; der andere Weg führt, wie *Neuberg* gezeigt hat, unter aeroben Bedingungen vor sich gehend, zum Acetaldehyd.

Es schien uns nun von Wichtigkeit, festzustellen, ob das Gehirn befähigt ist, Zucker auch zu Acetaldehyd abzubauen, und ob sich hier Unterschiede zwischen körpereigenen und körperfremden Kohlehydraten ergeben.

Um den Weg des oxydativen Zuckerabbaues zu verfolgen, haben wir eine höchst einfache und zuverlässige Methode in dem sinnreichen Abfangverfahren von *Neuberg*[2]). Dieses besteht darin, daß man den bei dem oxydativen Abbau des Zuckers entstehenden Acetaldehyd in statu nascendi abfängt mit Hilfe eines Sulfits, zu dem der Aldehyd eine große Affinität besitzt. In dieser Bindung wird der sonst höchst unbeständige Acetaldehyd vor weiteren Veränderungen, wie Übergang in Alkohol oder Essigsäure, geschützt und kann nun von dem Sulfit getrennt und quantitativ bestimmt werden.

Zu unseren Versuchen verwandten wir ausschließlich menschliches Gehirn; es stammte von Leichen, die etwa 30 Stunden nach Eintritt des Todes im hiesigen pathologischen Institut zur Sektion gekommen waren. Das Gehirn wurde zunächst vom anhaftenden Blute durch Abspülen befreit, dann ein aliquoter Teil in der Reibeschale fein verrieben und zunächst ohne irgend einen Zusatz von Kohlehydraten auf Aldehydbildung nach Vorschrift von *Neuberg* geprüft. Dabei stießen wir zunächst auf eine Schwierigkeit insofern, als bei einer Versuchsdauer von 22 Stunden im Brutschrank in sehr vielen Versuchen trotz Zusatz eines Desinfizienz (Optochin. bas.) und trotz aller Kautelen vorzeitig Fäulnis eintrat. Wir entschlossen uns, als trotz aller Sorgfalt und der verschiedensten Abänderungen das Auftreten von Fäulnisvorgängen nicht zu verhindern war, die Aufenthaltsdauer im Brutschrank zu reduzieren, und fanden schließlich als für die Ausbeuten günstigste Bedingung achtstündigen Aufenthalt im Brutschrank und nach-

[1]) *R. O. Loebel*, diese Zeitschr. **161**, 219, 1925.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 365, 1918; **92**, 234, 1918.

trägliches Stehenlassen im Eisschrank bis zum nächsten Tage (15 Stunden). Bei dieser Versuchsdauer hatten wir niemals den Verlust eines Versuchs durch Fäulnis zu beklagen. Allerdings waren wir uns klar, daß bei dieser sehr kurzen Wirkungszeit auch der Effekt kein sehr großer sein werde.

Die Versuche mit Gehirnsubstanz allein ohne Zusatz eines Kohlehydrats hatten in der weitaus größten Mehrzahl der Fälle ein positives Resultat. Doch waren die gefundenen Werte (s. weiter unten) sehr klein, entsprechend dem geringen Gehalt der Gehirne an disponiblen Kohlehydraten. Denn da die Organe erst etwa 30 Stunden post exitum und noch später zur Untersuchung kamen, waren natürlich vom Glykogen höchstens nur noch Spuren vorhanden.

Danach prüften wir das Verhalten des Gehirns in Gegenwart der verschiedensten Kohlehydrate wie Glucose, Glykogen, Milchzucker, Lävulose, Galaktose, ferner den Einfluß des Insulins auf die Acetaldehydbildung, und schließlich wurde auch untersucht, ob sich irgendwelche Unterschiede erkennen lassen zwischen grauer und weißer Substanz.

Aus der großen Zahl der Untersuchungen seien nur einige wenige hier wiedergegeben.

I. Versuche mit Glucose.

1. 50 g Gehirn — 36 Stunden post exitum entnommen — werden in der Reibeschale mit 150 ccm 0,9proz. steriler NaCl-Lösung zu einem homogenen Brei verrieben, in eine sterile Flasche übertragen, nacheinander mit 2,0 g Calciumsulfit, 10 ccm Phosphatpuffer (p_H = 6,3) und 0,7 g Optochinum basicum und 1,0 g Glucose, gelöst in 20 ccm physiologischer NaCl-Lösung, versetzt, 8 Stunden im Brutschrank bei 37° C unter häufigem Schütteln gehalten und dann auf 15 Stunden in den Eisschrank gestellt.

Destillation nach Zusatz von 5 g $CaCO_3$ + 5 g $CaCl_2$.

Redestillation über 5 Tropfen 10proz. H_2SO_4.

Redestillation über 0,5 g $PbCO_3$.

Zum Destillat 1,0 ccm 2proz. Hydroxylaminsulfatlösung, 60 Minuten bei 30° C. Danach Titration mit n/10 NaOH gegen Methylorange als Indikator; verbraucht 0,48 ccm.

Acetaldehydmenge 0,48 — 0,06 (Leertitration) = 0,42 × 4,4 × 2 = 3,684 mg pro 100 g Gehirn.

Kontrolle: ohne Glucose, sonst die gleiche Zusammensetzung; Verarbeitung wie vorhin.

Acetaldehydmenge: 0,264 mg pro 100 g Gehirn.

2a. 50 g Gehirn + 150 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 2 g Calciumsulfit + 0,7 g Optochin. bas. + 10 ccm Pufferlösung (p_H = 6,3) + 1,0 g Glucose; 8 Stunden bei 37° C, 15 Stunden bei 6° C.

Verarbeitung wie oben.

Acetaldehydmenge: 3,96 mg pro 100 g Gehirn.

Kontrolle: 0,528 mg pro 100 g Gehirn.

In diesem Versuch zeigte bei der dritten Destillation das Bleicarbonat eine ganz schwache Graufärbung, eine Zeichen von Spuren von H_2S; in dem Kontrollversuch blieb die Bleiverbindung weiß.

2b. Parallelversuch mit dem gleichen Gehirn in der gleichen Zusammensetzung.

Glucoseportion: 4,302 mg Acetaldehyd pro 100 g Gehirn.
Kontrolle: 0,528 mg Acetaldehyd pro 100 g Gehirn.

Hier war in beiden Versuchen das Bleicarbonat weiß geblieben, also keine Fäulnis eingetreten. Fäulnis führt also nicht etwa zu größeren Ausbeuten an Aldehyd, sondern setzt sie im Gegenteil herab. Diese Beobachtung haben wir besonders in den ersten Versuchen machen können, die wir über 24 Stunden im Brutschrank hielten. Hier war trotz der längeren Versuchsdauer mitunter die Aldehydmenge in der Zuckerportion nicht größer als in der zuckerfreien Kontrolle. Offenbar wird durch den Fäulnisprozeß der Aldehyd trotz der Bindung an Sulfit weiter zersetzt.

II. Versuche mit Glykogen.

1. 50 g Gehirn + 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 2 g Calciumsulfit + 0,7 g Optochin. bas. + 10 ccm Pufferlösung ($p_H = 6{,}3$) + 1,0 g Glykogen, gelöst in 30 ccm physiologischer NaCl-Lösung. 8 Stunden im Brutschrank, 15 Stunden im Eisschrank.

Verarbeitung wie oben.
Acetaldehydmenge: 2,20 mg pro 100 g Gehirn.
Kontrolle: 0,724 mg pro 100 g Gehirn.

2. 50 g Gehirn + 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 2 g Calciumsulfit + 0,7 g Optochin. bas. + 10 ccm Pufferlösung ($p_H = 6{,}3$) + 1,0 g Glykogen, gelöst in 30 ccm physiologischer NaCl-Lösung. 8 Stunden im Brutschrank, 15 Stunden im Eisschrank.

Verarbeitung wie oben.
Acetaldehydmenge: 1,056 mg pro 100 g Gehirn.
Kontrolle: 0,264 mg pro 100 g Gehirn.

III. Versuche mit Milchzucker, Galaktose und Lävulose.

1. 50 g Gehirn + 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 2 g Calciumsulfit + 0,7 g Optochin. bas. + 10 ccm Pufferlösung ($p_H = 6{,}3$) + 1,0 g Milchzucker, gelöst in 20 ccm physiologischer NaCl-Lösung. 8 Stunden bei 37° C, 15 Stunden bei 6° C.

Verarbeitung wie oben.
Acetaldehydmenge: 2,288 mg pro 100 g Gehirn.
Kontrolle: 0,264 mg pro 100 g Gehirn.

2. 50 g Gehirn (von derselben Leiche) + 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 2 g Calciumsulfit + 0,7 g Optochin. bas. + 10 ccm Pufferlösung ($p_H = 6{,}3$) + 1,0 g Galaktose, gelöst in 20 ccm physiologischer NaCl-Lösung. 8 Stunden bei 37° C, 15 Stunden bei 6° C.

Acetaldehydmenge: 1,368 mg pro 100 g Gehirn.
Kontrolle: 0,264 mg pro 100 g Gehirn.

3. Die Resultate mit Lävulose waren stets negativ, so oft wir auch die Versuche mit dem verschiedensten Gehirnmaterial wiederholten.

Wenn wir von den Versuchen mit Lävulose absehen, so hat sich in allen anderen gezeigt, daß menschliches Gehirn imstande ist, Kohlehydrate auf oxydativem Wege abzubauen. Als besonders guter Aldehydbildner hat sich Glucose erwiesen. Verglichen mit der menschlichen Leber bleibt anscheinend die Wirkung des Gehirns beträchtlich hinter ihr zurück. Denn *Wohlgemuth* und *Sorochowitsch*[1]) konnten für dieses Organ Werte von 11 bis 12 mg-Proz. feststellen. Hierbei ist aber zweierlei zu berücksichtigen. Einmal erstreckten sich diese Versuche über 20 Stunden bei 37° C, und dann sind von diesen Zahlen die Werte für die Kontrollen in Abzug zu bringen. Diese sind aber, entsprechend dem eigenen hohen Glykogengehalt der Leber, recht beträchtlich (9,152 mg-Proz. bzw. 7,634 mg-Proz.). Wenn wir diese Werte subtrahieren, so reduzieren sich die von der Leber ausschließlich aus der zugesetzten Glucose gebildeten Acetaldehydmengen auf etwa 4 mg-Proz. Von annähernd derselben Größenordnung sind auch die Aldehydmengen, die die Gehirnsubstanz aus Glucose zu bilden vermag. Hiernach scheint der oxydative Zuckerabbau im Gehirn dem in der Leber nicht wesentlich nachzustehen.

Nicht so günstig wie mit Glucose waren die Resultate mit Glykogen, Milchzucker und Galaktose; letztere erwies sich als schwächster Aldehydbildner. Im Hinblick auf die Versuche von *Else Hirschberg* (l. c.), nach denen Froschrückenmark aus der umgebenden Flüssigkeit Galaktose in fast gleichem Ausmaß zum Verschwinden bringt wie Glucose, ist dieses Resultat recht bemerkenswert. Diese Differenz erklärt sich so, daß von dem Gehirn Galaktose anaerob leichter zersetzt wird als aerob. Den Beweis hierfür liefern die schönen Untersuchungen von *R. O. Loebel*, nach denen Galaktose schneller glykolysiert wird als Glykogen.

Zahlreiche Versuche mit Milchsäure, Alanin und Glykokoll hatten stets ein negatives Ergebnis.

Hiernach wurde untersucht, ob sich vielleicht Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz bezüglich der Aldehydbildung erkennen lassen. Zu dem Zwecke mußte eine Trennung der grauen von der weißen Substanz vorgenommen werden. Das geschah in der Weise, daß das Gehirn zunächst in flache Schnitte zerlegt und dann die graue Hirnrinde, soweit es möglich war, mit einem kleinen Skalpell von der weißen Masse vorsichtig abgetragen wurde. Natürlich war es nicht zu umgehen, daß kleine Teile weißer Substanz dabei mitgetroffen wurden; aber im großen und ganzen erreichten wir doch das Ziel und konnten graue Substanz getrennt von weißer untersuchen; und zwar wurde ihr Verhalten gegenüber Glucose, Glykogen, Milchzucker und Galaktose

[1]) *J. Wohlgemuth* und *Sorochowitsch*, Arch. f. Verdauungskrankh. **37**, 225, 1926.

geprüft. Von allen Versuchen sei aus den Protokollen nur je ein Versuch mitgeteilt.

Die Versuche wurden sämtlich mit 50 g Gehirn ausgeführt, hatten die übliche Zusammensetzung, die gleiche Versuchsdauer und wurden in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet. Wir beschränken uns deshalb auf die Wiedergabe der Resultate in folgender Tabelle; die Zahlen bedeuten Milligramme Acetaldehyd pro 100 g Gehirn.

Tabelle I.

	Glucose		Glykogen		Milchzucker		Galaktose	
	+ 1,0 g	−	+ 1,0 g	−	+ 1,0 g	−	+ 1,0 g	−
Graue Substanz . .	6,95	0,44	1,32	0,26	1,06	0,44	1,32	0,44
Weiße Substanz . .	0,71	0,44	0,88	0,26	0,44	0,44	1,13	0,44

Aus allen Versuchen geht übereinstimmend hervor, daß die graue Substanz weit wirkungsvoller ist als die weiße. Besonders deutlich in die Erscheinung tritt dies im Glucoseversuch. Aber auch gegenüber dem Glykogen und dem Milchzucker erweist sich die graue Substanz als die wirksamere, während bei der Galaktose der Unterschied ein viel geringerer ist. Schon *E. Hirschberg* hatte auf Grund der Beobachtung, daß der Umsatz in peripheren Nerven weit geringer ist als im Rückenmark, die Vermutung geäußert, daß die graue Substanz wahrscheinlich einen regeren Kohlehydratstoffwechsel entfaltet als die weiße Substanz. Durch unsere Untersuchungen ist nun der Beweis erbracht, daß in der Tat der oxydative Kohlehydratumsatz in der grauen Substanz dem in der weißen weit überlegen ist. Ob dies auch für die anaerobe Zuckerspaltung gilt, wäre noch erst zu entscheiden.

Aus dieser Beobachtung von der Überlegenheit der grauen Substanz über die weiße konnte man deduktiv folgern, daß in den peripheren Nerven, die doch nur aus weißer Nervensubstanz bestehen, ein aerober Zuckerabbau, wenn überhaupt nur in ganz geringem Maße stattfindet. In der Tat hatten alle Versuche, die wir mit dem Nervus ischiadicus ausführten, ein negatives Ergebnis bis auf Versuche mit Glucose; hier konnten wir eine minimale Aldehydbildung konstatieren. Auf die Wiedergabe der Protokolle sei deshalb verzichtet.

Endlich war noch zu entscheiden, wie der oxydative Abbau in der Gehirnsubstanz in Gegenwart von Insulin verläuft. Aus den Untersuchungen von *Neuberg* und seinen Mitarbeitern wissen wir, daß Insulin die Acetaldehydbildung in der Leber und im Muskel des Meerschweinchens ganz beträchtlich steigert. *Wohlgemuth* und *Sorochowitsch* konnten auch bei der menschlichen Leber eine gleichsinnige Beeinflussung beobachten, jedoch nur in geringem Maße. Bei der Untersuchung

menschlicher Gehirnsubstanz zeigte sich nun nicht nur keine Verstärkung der Aldehydbildung, sondern eine gerade entgegengesetzte Wirkung. Hierfür zwei Beispiele.

Der eine Versuch wurde mit einem Gemisch von grauer und weißer Substanz, der andere mit grauer und weißer Substanz getrennt ausgeführt. Die Zusammensetzung und Versuchsdauer war die übliche, die Verarbeitung wie oben beschrieben.

Versuch 1.

50 g Gehirn + 1,0 g Glucose + 1,0 ccm Insulin (*Wellcome*) lieferten an Aldehyd	2,55	mg-Proz.
50 g Gehirn + 1,0 g Glucose (*Wellcome*) lieferten an Aldehyd	3,17	„
50 g Gehirn (Kontrolle) lieferten an Aldehyd . .	0,26	„

Versuch 2.

a) Graue Substanz.

50 g Gehirn + 1,0 g Glucose + 1,0 ccm Insulin lieferten an Acetaldehyd	3,96	mg-Proz.
50 g Gehirn + 1,0 g Glucose lieferten an Acetaldehyd	4,40	„
50 g Gehirn (Kontrolle) lieferten an Acetaldehyd	0,44	„

b) Weiße Substanz.

50 g Gehirn + 1,0 g Glucose + 1,0 ccm Insulin lieferten an Acetaldehyd	2,46	„
50 g Gehirn + 1,0 g Glucose lieferten an Acetaldehyd	3,27	„
50 g Gehirn (Kontrolle) lieferten an Acetaldehyd	0,44	„

Aus beiden Versuchen geht hervor, daß in Gegenwart von Insulin die Aldehydbildung aus Glucose hinter der ohne Insulin zurückbleibt. Insulin schützt also gleichsam die Glucose vor dem oxydativen Abbau durch die Nervenzelle. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Asher* und *Takahashi*, sowie von *Winterstein* und *Hirschberg*, wonach bei Gegenwart von Insulin das Glykogen aus dem Gehirn viel langsamer verschwindet als bei Abwesenheit. Das Insulin hat somit auf die zuckerspaltenden Fermente im Gehirn die entgegengesetzte Wirkung wie auf die gleichen Fermente in Leber und Muskel. Da nun nicht anzunehmen ist, daß diese Fermente voneinander verschieden sind, so darf man wohl vermuten, daß die veränderte Wirkung des Insulins begründet ist in den anders gearteten Stoffwechselvorgängen in der Nervenzelle.

Zusammenfassung.

1. Das menschliche Gehirn ist imstande, Zucker auf oxydativem Wege abzubauen. Als bester Aldehydbildner erwies sich die Glucose, dann folgte Glykogen, Lactose und Galaktose; Lävulose war unwirksam, ebenso Milchsäure und Aminosäuren.

2. Die graue Substanz ist in ihrer Wirkung weit überlegen der weißen Substanz.

3. Im Gegensatz zu Leber und Muskel verstärkt Insulin im Gehirn nicht nur nicht die Aldehydbildung, sondern setzt sie sogar herab.

Über die vermeintliche Hydrolyse der Stärke durch Salze und Eiweißabbauprodukte.

Von

Kazuji Takane (Tokio).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

Von verschiedenen Autoren wird seit einiger Zeit die Anschauung vertreten, daß Salze, Aminosäuren und Peptone in der gleichen Weise Substrate spalten können wie Fermente. So hat *Schlatter*[1]) behauptet, daß Peptone unter bestimmten Bedingungen Glucose zu Milchsäure vergären können. Doch hat sich bei gründlicher Nachprüfung[2]) seiner Versuche durch *Acklin* sowie *Barthel* und *v. Euler* gezeigt, daß hier eine Täuschung durch Bakterienwirkung vorliegt.

Für das diastatische Ferment haben *Biedermann*[3]), *Iljin*[4]) und *Haehn*[5]) behauptet, daß eine ihm ganz ähnliche Wirkung auf Stärke erzielt werden kann durch Salze, Aminosäuren und Peptone.

Als erster hat *Biedermann*[3]) den Nachweis zu führen gesucht, daß in Stärkelösung allein, die nach besonderer Vorschrift hergestellt war, bei Brutschranktemperatur sich spontan ein diastatisches Ferment bildet, dieses bisweilen eine komplette Hydrolyse der Stärke herbeiführt, und daß der Effekt durch die Gegenwart von Salzen noch bedeutend verstärkt werden kann. Bei der Wichtigkeit dieses Befundes für das Wesen der Fermentbildung überhaupt hat man diese Angabe vielfach nachgeprüft, doch ist sie nicht in allen Fällen bestätigt worden.

So hat *Wohlgemuth*[6]) niemals eine Selbstauflösung der Stärke beobachtet, wenn er bei den Versuchen die Mitwirkung von Bakterien gänzlich

---

[1]) *Schlatter*, diese Zeitschr. **181**, 362, 1922.

[2]) *O. Acklin*, diese Zeitschr. **189**, 452, 1923; **142**, 351, 1923. — *Chr. Barthel* und *E. v. Euler*, Zeitschr. f. phys. Chem. **128**, 257, 1923.

[3]) *W. Biedermann*, Fermentforschung **1**, **2**, **4**, **5**, **7**; ferner diese Zeitschr. **185**, 282, 1923; **187**, 35, 1923.

[4]) *W. S. Iljin*, diese Zeitschr. **182**, 511, 1922.

[5]) *H. Haehn*, ebendaselbst **185**, 587, 1923.

[6]) *J. Wohlgemuth*, ebendaselbst **94**, 213, 1919.

ausschloß. Zu den gleichen negativen Resultaten kamen *Teschendorf*[1]) und *Rothlin*[2]). Daraufhin hatte *Biedermann* die Idee der spontanen Entstehung einer Amylase zunächst fallen lassen und den positiven Ausfall seiner Versuche damit zu erklären versucht, daß der von ihm verwandten Stärke vielleicht noch Spuren von Amylase anhafteten. Auf Grund weiterer Untersuchungen ist er dann wieder zu seiner alten Anschauung zurückgekehrt. Allerdings erklärt er nunmehr die Luftzufuhr für ein unbedingtes Erfordernis, um zu einem positiven Resultat zu kommen, und hält außerdem noch die Gegenwart von Glykokoll für sehr wichtig. Zu ganz anderen Resultaten kam *Haehn* insofern, als er mit Neutralsalzen allein in den meisten Fällen überhaupt keinen Abbau beobachtete, auch wenn er Neutralsalze mit Albumosenlösung mischte; Zusatz von Aminosäuren (Alanin + Leucin) ergab öfters, aber nicht immer ein positives Resultat. Wenn er dagegen Neutralsalze mit Albumosen und Aminosäuren vereinte, bemerkte er fast immer einen Stärkeabbau. Am besten gelangen ihm die Versuche mit Pepton, das allein schon hydrolysierend auf die Stärke wirken soll. Im Gegensatz zu *Biedermann* und *Haehn* kam schließlich *Iljin* zu dem Resultat, daß der Abbau der Stärke durch anorganische Salze am besten gelingt, wenn man beide in äußerst starker Verdünnung anwendet.

Diese verschiedenen Widersprüche suchte ich nun durch eigene Versuche aufzuklären. Zunächst wurden die Versuche von *Iljin* als die einfachsten einer Nachprüfung unterzogen.

Leider sind seine Angaben über die Versuchsanordnung so allgemein gehalten, daß eine genaue Kontrolle nicht möglich ist. Er arbeitete mit einem Stärkekleister von 0,01 bis 0,02 Proz., setzte ihm Chloride in verschiedenen Konzentrationen zu — am wirksamsten erwiesen sich ihm Lösungen von m/100 bis m/1000 — und prüfte periodisch das Verhalten der Stärkelösung gegenüber Jod.

Dementsprechend ging ich so vor, daß ich drei Versuchsreihen mit je 5,0 ccm 0,01proz. Stärkekleister + je 5,0 ccm m/100 bzw. m/500 bzw. m/1000 NaCl ansetzte, und zwar von jeder Mischung vier gleiche Portionen, und die Gläschen zunächst auf 3 Stunden ins Wasserbad, danach auf weitere 24 bis 48 Stunden in den Brutschrank stellte. Dabei zeigte sich in allen Portionen der drei Reihen keine Veränderung, erst nach 48 Stunden färbte sich in einem Gläschen der Reihe mit m/100 NaCl die Stärke auf Zusatz von Jod hellrot, in sämtlichen anderen Gläschen blau. Diese Versuche wurden des öfteren wiederholt, stets mit dem gleichen Resultat, daß ganz vereinzelt das eine oder das andere Gläschen einen Stärkeabbau zeigte, alle anderen aber keine Änderung erkennen ließen; dagegen war mitunter in der salzfreien Kontrolle die Stärke abgebaut. Hiernach wurden Versuche mit kleineren Stärkequantitäten (2,0 ccm) angesetzt und der gleichen Kochsalzmenge; hier

[1]) *Teschendorf*, Fermentforschung 4, 184, 1920.

[2]) *E. Rothlin*, ebendaselbst 6, 103, 1922; Münch. med. Wochenschr. 1922, S. 88 und 1393.

war der Effekt ein wesentlich anderer. Ich führe als Beleg ein Beispiel an, in dem die Zahlen die Nummern der Portionen bedeuten; Nr. 1, 2, 3 haben die gleiche Zusammensetzung, Nr. 4 ist die salzfreie Kontrolle.

m/100: nach 24 Stunden 2 und 3 achromisch, 1 und 4 blau.

m/500: nach 24 Stunden 1 blau, 2 hellviolett, 3 kirschrot, 4 achromisch, nach 48 Stunden das gleiche Resultat.

m/1000: nach 24 Stunden 1 blau, 3 hellblau, 2 und 4 achromisch, nach 48 Stunden 1, 2, 4 achromisch, 3 hellblau.

Hiernach sehen wir zwar, daß in verschiedenen Gläsern die Stärke abgebaut ist, aber auch die salzfreie Kontrolle enthält in den beiden letzten Reihen keine Stärke mehr.

Das Resultat war ein vollkommen anderes, sobald wir die Stärkelösung sowohl wie die Salzlösungen vor ihrer Vereinigung kochten. Wenn wir mit diesen gekochten Lösungen in der gleichen Weise wie oben den Versuch unter Verwendung gut sterilisierter Gläser ansetzten, zeigte sich selbst nach 48 stündigem Stehen im Brutschrank in keinem Gläschen ein Stärkeabbau.

Es geht somit aus diesen Versuchen hervor, daß, wenn man nach den Angaben von *Iljin* arbeitet, man oft ein Verschwinden der Stärke beobachten kann. Das kann aber in den Portionen ohne Salzzusatz ebenso geschehen wie in den salzhaltigen Lösungen. Dies erscheint uns nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, daß einmal die Stärkemenge in einem solchen Gläschen außerordentlich gering ist — 2,0 ccm einer 0,01proz. Lösung entsprechen 0,2 mg Stärke —, dann aber auch, daß bei 24- oder gar 48stündigem Stehen im Brutschrank eine Keiminfektion nicht zu vermeiden ist, wenn man wie *Iljin* ohne Desinfiziens arbeitet. Als Beweis hierfür können die Versuche mit vorher gekochter Lösung gelten, in denen niemals ein Abbau beobachtet wurde.

Was nun die Versuche von *Biedermann* anbetrifft, so hat er in seinen späteren Publikationen als entscheidendes Moment für die günstigen Effekte von Salzen die Mitwirkung des Sauerstoffs in den Vordergrund gestellt. In seiner Arbeit „Die Salzhydrolyse der Stärke", diese Zeitschr. **135**, 287, 1923, gibt er für diesen Versuch eine Vorschrift, nach der „jedermann leicht und mit absolut sicherem, raschem Erfolg" arbeiten kann. Diese Vorschrift lautet, daß man von einer in ganz bestimmter Weise hergestellten Lösung von Kartoffelstärke 5 ccm mit der gleichen Menge einer frisch bereiteten Phosphatmischung (0,3 g NaH_2PO_4 + 0,8 g Na_2HPO_4 + 0,5 g NaCl + Aqua dest. 100,0) mischt und nach Aufkochen und Abkühlen der Probe 15 Minuten lang kräftig schüttelt (Probe a). Eine zweite Probe (b) wird in ganz gleicher Weise hergestellt, aber nicht mit Luft geschüttelt, und eine dritte, als Kontrolle dienende Probe (c) enthält an Stelle der Phosphatmischung destilliertes

Wasser; diese wird wieder wie Probe a 15 Minuten lang mit Luft geschüttelt. Genau nach dieser Vorschrift bin ich vorgegangen und habe außer den drei Proben noch eine vierte (d) angesetzt, die wie die erste angestellt war, nur daß ich nach dem Schütteln die Lösung sofort mit Toluol durchschüttelte. Die Versuche wurden zu wiederholten Malen ausgeführt, alle 30 Minuten kleine Proben entnommen und ihr Verhalten zu dünner Jodlösung geprüft. Aus den zahlreichen Versuchen, die wir in dieser Weise anstellten, seien nur zwei herausgegriffen.

	Versuch 1				Versuch 2			
	nach 30 Min	nach 60 Min.	nach 180 Min.	nach 24 Stdn.	nach 30 Min.	nach 60 Min.	nach 180 Min.	nach 24 Stdn.
a	blau	blau	hellblau	rot	violett	kirschrot	hellrot	achromisch
b	„	„	violett	achromisch	blau	„	„	„
c	„	„	blau	rot	„	blau	blau	blau
d	„	„	violett	achromisch	„	violett	kirschrot	achromisch

Aus beiden Beispielen geht hervor, daß in der Tat eine Stärkelösung in Gegenwart der *Biedermann*schen Salzlösung bis zum achromischen Punkt abgebaut werden kann. Aber niemals haben wir das in dem kurzen Zeitraum von 3 Stunden beobachtet, sondern immer erst nach Verlauf von 24 Stunden, und dann auch nicht immer in den Proben, die 15 Minuten lang mit Luft geschüttelt wurden, sondern ebensooft in den ungeschüttelten Proben. Schließlich haben wir des öfteren auch in der Kontrolle, die statt der Salzlösung nur destilliertes Wasser enthielt, mitunter einen Abbau der Stärke feststellen können.

Wir haben uns demnach nicht davon überzeugen können, daß die von *Biedermann* gegebene Vorschrift das von ihm geschilderte Ergebnis garantiert.

Die gleichen schwankenden Resultate hatten wir bei Verwendung der löslichen Stärke *(Kahlbaum)*, auf deren Wiedergabe wir verzichten.

Man konnte nun daran denken, daß dieses ungünstige Ergebnis in unseren Versuchen bedingt war durch ein ungeeignetes Stärkepräparat. Wir haben uns deshalb zehn verschiedene Präparate von Kartoffelstärke beschafft und mit allen Proben verschiedentlich Versuche nach Vorschrift von *Biedermann* angestellt. In keinem einzigen Falle habe ich einen Abbau bis zum achromischen Punkt nach 3 Stunden beobachtet. Wenn ich einem solchen begegnete, so war das frühestens erst nach Verlauf von 24 Stunden. Dieses Vorkommnis beobachtete ich im ganzen nur bei zwei Stärkepräparaten. Aber auch hier war das Resultat nicht immer reproduzierbar. Wenn ich z. B. 12 Portionen mit ein und derselben Stärkelösung von der gleichen Mischung a (s. oben) ansetzte und schüttelte, so war nach 24 Stunden in zwei Gläschen die Stärke bis zum achromischen Punkt abgebaut, in drei Gläschen violett und in

den übrigen sieben Gläschen blau. Wenn *Biedermanns* Angaben zu Recht bestanden, so hätten wir doch zum mindesten in der weitaus größten Zahl ein positives Resultat erhalten müssen. Daß aber nur zwei Proben ein positives, zehn ein negatives Ergebnis hatten, deutet doch darauf hin, daß hier irgendwelche Momente mit im Spiele sind, die zu erkennen oder zu deuten wir noch nicht imstande sind.

Auf einen Punkt sei noch besonders hingewiesen. *Biedermann* mischt die Stärkelösung und Salzlösung in der beschriebenen Weise, erhitzt diese Lösung 15 Minuten, kühlt ab und schüttelt dann 15 Minuten gründlichst durch. Bei diesem Vorgehen, das wir stets genau befolgten, erhielten wir jene wenig erfreulichen Resultate. *Wenn wir dagegen so verfuhren, daß wir die Stärkelösung und Salzlösung vor der Vereinigung jede für sich mindestens 15 Minuten lang kochten und dann mischten, so war das Resultat in jedem einzelnen Falle negativ. In sämtlichen derart durchgeführten Versuchen gab die Stärkelösung noch nach 24 Stunden mit Jod eine unverändert blaue Farbe.* Hierauf werden wir weiter unten noch einmal zurückkommen.

In einer weiteren Arbeit hat *Biedermann* dann angegeben, daß seine Resultate noch weit besser ausfielen, wenn er die Stärke-Salzlösung nicht bloß 15 Minuten schüttelte, sondern wenn er ständig Luft durchleitete und die Stärkelösung mit der Salzlösung noch einmal auf die Hälfte verdünnte. Auch nach dieser Vorschrift, die wir bis ins kleinste und aufs genaueste befolgten, haben wir eine große Zahl von Versuchen mit ständiger Luftdurchleitung angestellt, und zwar verwandten wir hierfür, wie *Biedermann* angegeben hat, sowohl seine Phosphatkochsalzmischung wie n/2 NaCl (3proz. Lösung), wie n/2 KCl (3,7proz Lösung). Aber auch so waren unsere Resultate um nichts besser. In keinem einzigen Falle beobachteten wir innerhalb 3 Stunden einen Abbau bis zum achromischen Punkt. In ganz vereinzelten Fällen war die Lösung nach 24 Stunden achromisch, und dies auch nur in den Portionen, durch die ständig Luft durchgeleitet wurde. Die Versuchsanordnung mit den Glasschalen, wo das Stärke-Salzgemisch in großer Fläche der Luftwirkung ausgesetzt war, blieb in sämtlichen Fällen negativ; hier war auch nach 24 Stunden kaum eine Veränderung der Reaktion zu konstatieren, entweder reagierte die Stärkelösung blau oder im günstigsten Falle violett. Selbst nach 48 Stunden änderte sich nichts an der Reaktion. Diese Versuche wurden von uns mit verschiedenen Stärkeproben, auch mit löslicher Stärke *(Kahlbaum)* angestellt, stets mit dem gleichen Mißerfolg.

Als wesentliche Verbesserung der Versuchsbedingungen gibt *Biedermann*[1]) noch den Zusatz von Glykokoll sowie Alanin und Leucin

[1]) *Biedermann*, diese Zeitschr. 135, 290, 1923.

an, ferner den Zusatz von Albumosen. Über diesen Punkt soll weiter unten im Zusammenhang mit den Versuchen von *Haehn* ausführlich diskutiert werden. Hier sei nur auf die Art der Herstellung der von *Biedermann* verwandten Albumose hingewiesen, die uns recht bedenklich zu sein scheint. Er empfiehlt, 4 bis 5 g Rohfibrin in 150 ccm alkalischem Wasser mit Trypsin *Grübler* bei 40° zu verdauen bis zum Verschwinden der Biuretprobe, die Lösung nach vorheriger Neutralisation mit Salzsäure auf etwa ein Drittel einzuengen und die so gewonnene Albumosenlösung zum Versuch zu verwenden. Nun ist aber bekanntlich das Trypsin *(Grübler)* nicht bloß ein hochwertiges eiweißspaltendes Präparat, sondern vor allem ein besonders hochwertiges stärkespaltendes. Bei dem hier geschilderten Verfahren ist jedoch keineswegs die Garantie dafür gegeben, daß das Ferment tatsächlich vollkommen zerstört ist, auch nicht, wenn man, wie *Biedermann* vorschreibt, nachher 3 ccm Albumosenlösung mit 3 ccm 1proz. NaCl-Lösung verdünnt, 6 ccm Stärkelösung zugibt und nun noch einmal aufkocht. Minimale Spuren von Ferment können bei diesem Verfahren immer noch sich erhalten haben.

Zu ähnlichen Resultaten wie *Biedermann* war fast zu gleicher Zeit *Haehn* gekommen. Was zunächst die Wirkung von Neutralsalzen anbetrifft, so gibt er an, daß sie den Abbau sowohl von Kartoffelstärke wie von löslicher Stärke herbeiführen, und teilt als Beleg hierfür zwei Versuchsreihen mit (S. 590, Tabelle I und II). Wie schwankend aber seine Resultate sind, illustrieren sechs andere Versuchsreihen von ihm (Tabelle III, IV, V, VI, VII, VIII), wo *in keinem einzigen Falle* auch nur eine Spur von Abbau durch das Neutralsalzgemisch erzielt wurde, obwohl er stets die gleiche Stärkelösung wie in Tabelle I und II verwandte, und obwohl er hier bisweilen die Versuchsdauer sogar über 43 Stunden im Brutschrank ausdehnte. Wir haben deshalb auf eine Nachprüfung speziell dieser Versuche verzichtet, zumal wir uns bereits oben zu der Frage der Salzwirkung ausführlich geäußert haben, und haben uns nur mit dem von ihm angegebenen Salz-Aminosäuren-Pepton-Gemisch beschäftigt, das nach seinen Angaben die besten Resultate liefert.

Als Salzlösung verwendet er ein Gemisch von m/10 NaCl + m/10 KCl + m/10 $CaCl_2$ zu gleichen Teilen; das Aminosäuregemisch setzt sich zusammen aus m/10 Alanin + m/10 Leucin; die 1proz. Peptonlösung wurde mit dem Präparat von *Witte* (Rostock) hergestellt. Die Stärkelösungen wurden hergestellt aus löslicher Stärke *(Kahlbaum)* und aus Kartoffelstärke. Mit den gleichen Lösungen stellte ich meine Versuche an, und zwar nahm ich die Verteilung der Lösungen genau so vor, wie *Haehn* angibt. Als Beispiel sei ein Versuch hier mitgeteilt.

Versuchsnummer:	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Reaktionsgemisch in ccm										
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch .	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Peptonlösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5

Nach dieser Vorschrift habe ich jedesmal gleichzeitig zwei Reihen angesetzt, die eine mit löslicher Stärke (A), die andere mit Kartoffelstärke (K). Derartige Reihen habe ich mehr als 20mal angestellt und dabei ganz unregelmäßige Resultate erhalten. In Rücksicht auf den bemessenen Raum will ich zur Illustration nur zwei Doppelreihen kurz mitteilen.

Versuchsreihe II.

0,5proz. Lösung A: 1, 2, 8 violett, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 blau.
0,5proz. Lösung K: 3, 4 violett, 9 rotviolett, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 blau.

Versuchsreihe III.

0,5proz. Lösung A: 1 rotviolett, 2, 6, 7 violett, 3, 4, 5, 8, 9, 10 blau.
0,5proz. Lösung K: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 blau.

Unter den vielen Versuchsreihen, die ich stets in der gleichen Weise anstellte, habe ich nicht eine einzige angetroffen, wie sie *Haehn* in seiner Tabelle VIII und IX angibt; in keinem einzigen Gläschen war jemals die Farbe hellrotbraun, geschweige denn gelb.

Da nach den Angaben von *Haehn* in den Gläschen 7, 8, 9 die Hydrolyse am sichersten vor sich geht, wegen der günstigsten Mischungsverhältnisse, wie er vermutet, habe ich schließlich nur noch mit diesen Gemischen gearbeitet und jedesmal 12 Gläschen mit Stärke A, 12 mit Stärke K angesetzt und 24 Stunden im Brutschrank gehalten. Aus 14 solcher Versuchsreihen teile ich zwei Beispiele mit.

I.

0,5 Proz. Stärke A: zwei achromisch, zwei kirschrot, eins braunrot, sieben blau.
0,5 Proz. Stärke K: fünf achromisch, eins violett, sechs blau.

II.

0,5 Proz. Stärke A: nach 24 Stunden alle Gläschen blau; nach 48 Stunden eins braunrot, drei violettrot, acht blau.
0,5 Proz. Stärke K: nach 24 Stunden eins achromisch, elf blau; nach 48 Stunden eins achromisch, vier violett, sieben blau.

Bei diesen stark schwankenden Ergebnissen lag es nahe, an ein von außen einwirkendes Moment, in erster Reihe an die Mitwirkung

von Bakterien zu denken; denn da in allen Gläschen die Mischungsverhältnisse absolut gleich waren, schien eine andere Erklärung dieser Unregelmäßigkeit nicht möglich. Zwar weist *Haehn* (l. c., S. 601) eine solche Annahme zurück; aber die Gründe, die er dagegen ins Feld führt, sind nicht gerade überzeugend. Statt diese zu diskutieren, ziehen wir es vor, über Versuche zu berichten, die wir einmal unter aseptischen Kautelen, dann aber auch mit Antiseptika anstellten. Die erstgenannte Art von Versuchen wurde so durchgeführt, daß wir zunächst die einzelnen Lösungen für sich durch längeres Kochen erhitzten und dann mit sterilen Pipetten auf sterile Reagenzgläser verteilten und mit Watte verschlossen in den Brutschrank brachten. Bei dieser Versuchsanordnung erhielten wir in keinem einzigen Falle ein positives Resultat; stets gab die Stärke mit Jod eine blaue Farbe. Auch *Haehn* hat solche Versuche ausgeführt und schreibt darüber S. 601: „Bei Anwendung von durch Hitze sterilisierten Lösungen und Reagenzgläsern mit Watteverschluß ist nur in drei Gläsern Abbau bis zum Erythrodextrin erfolgt, in den übrigen Gläsern war die Stärke unverändert geblieben. Wurde derselbe Versuch (steril) mit offenen Gläsern wiederholt, so trat bei 45° in 22 Stunden in allen Gläsern totale Hydrolyse ein." Hierbei ist nur nicht verständlich, ob im zweiten Versuch die Gläschen nur während des Sterilisierens oder auch während des Stehens im Brutschrank offen gehalten wurden. Im ersten Falle waren die Bedingungen die gleichen wie in unserem Versuch, da wir nicht in den Gläschen selber das Erhitzen vornahmen, sondern die Lösungen in sterilem Zustand in die sterilen Gläschen einfüllten. Im zweiten Falle, also beim Offenbleiben der Gläschen im Brutschrank, wäre eine nachträgliche Infektion keinesfalls auszuschließen. Dasselbe meist negative Ergebnis hatten wir, wenn wir mit einem Antiseptikum wie Toluol und Thymol arbeiteten, ohne daß wir die Lösungen vorher erhitzten. Hier beobachteten wir manchmal das Auftreten von Erythrodextrin besonders bei der Anwendung von Toluol, während wir mit Thymol nur in ganz wenigen Fällen eine hellviolette Farbe konstatieren konnten. Die letzteren Resultate stehen ebenfalls im Gegensatz zu denen von *Haehn*. Denn er sagt ausdrücklich S. 601: „Diese Versuchsanordnung (vgl. Thymoldesinfektion) gab bisher so ausgezeichnete Resultate, daß fast an eine günstige Mitwirkung des Thymols gedacht werden könnte." Dem widerspricht aber, was *Haehn* in seiner neuesten Publikation, S. 293, über Thymol sagt, nämlich daß es hemmend wirkt.

Diese zweite Arbeit von *Haehn* und *Berentzen*[1]) erschien, als ich meine Untersuchungen längst abgeschlossen hatte. Bei der mir noch zur

---

[1]) *H. Haehn* und *H. Berentzen*, Chemie der Zelle und Gewebe **12**, 286, 1925.

Verfügung stehenden kurzen Zeit war ich nicht in der Lage, auf alle Punkte dieser Arbeit näher einzugehen. Auch mußte ich in Rücksicht darauf, daß von den von *Haehn* und *Berentzen* verwandten Stärkesorten mir nur zwei zugänglich waren, mich mit der Wiederholung von nur zwei Versuchsreihen begnügen, und zwar mit den von ihnen auf S. 294 und 300 mitgeteilten Versuchen.

Zum ersten Versuch ist lösliche Stärke (*Kahlbaum*) erforderlich; diese war in drei verschieden alten Präparaten vorhanden; das eine war mindestens 5 Jahre alt, das zweite vor etwa 2 Jahren und das dritte ganz frisch aus der Fabrik bezogen.

Haehn arbeitet mit dem gleichen Salz-Aminosäuren-Peptongemisch wie früher; es setzt sich zusammen aus einer Salzmischung (m/10 KCl + m/10 NaCl + m/10 $CaCl_2$), aus einem Aminosäurengemisch (m/10 Alanin + m/10 Leucin) und einer 1proz. Peptonlösung (Wittepepton). Alle drei Lösungen werden zu gleichen Teilen gemischt und bilden sein „Normalsystem". Mit diesem System stellte ich in genau der gleichen Art wie *Haehn* und *Berentzen* Versuche an unter Verwendung von *Kahlbaums* löslicher Stärke. Zum Vergleich führe ich zunächst den Versuch von *Haehn* und *Berentzen* an und darunterstehend den meinigen. Versuchsdauer 20 Stunden bei 40°.

Versuchsnummer:	K	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Reaktionsgemisch in ccm											
Normalsystem . .	—	—	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Stärkelösung A .	0,5	0,5	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,6	7,5
Färbung auf Jodzusatz *H.* u. *B.* .	blau		gelb							hellbraun		
Eigener Versuch .	blau		gelbbraun	hellviolett	dunkelviolett	blau						

Im Gegensatz zu *Haehn* und *Berentzen* ist das Resultat in unserem Versuch ein durchweg negatives. Genau so ergebnislos fielen die Versuche mit den beiden anderen Kahlbaumstärken aus.

Die hellbraune Färbung in dem ersten Gläschen bedeutet nicht einen Stärkeabbau. Denn wenn man 0,1 ccm 1proz. Stärkelösung — das ist gleichbedeutend mit nur 2 Tropfen! — mischt mit 1,5 ccm Normalsystem, mit Wasser auf 10 ccm auffüllt und dann sofort die vorgeschriebenen 3 Tropfen n/10 Jodlösung zufügt, bekommt man sogleich wegen des großen Überschusses an Jod eine leicht dunkelbraune Lösung. Den späteren Übergang von einer etwas dunkleren Braunfärbung in ein helleres Braun (Nr. 1) wird wohl niemand als den Ausdruck eines Stärkeabbaus ansehen; das gleiche dürfte auch für das Gläschen 2 gelten, das nur 4 Tropfen Stärkelösung enthielt und eine hellviolette Farbe zeigte. Ein derartiges Resultat wie das oben angeführte von *Haehn* und *Berentzen*

haben wir in keinem einzigen Falle beobachten können, so oft auch die Versuche mit löslicher Stärke von uns wiederholt wurden. *In keinem einzigen Gläschen unserer sämtlichen Versuchsreihen sahen wir jemals auf Zusatz von Jod eine gelbe Farbe auftreten.*

Die zweite Versuchsserie wurde nach dem Vorgang von *Haehn* und *Berentzen* mit *Biedermann*scher Stärke — erwärmen von 1 g Kartoffelstärke bis auf 80°, übertragen in einen Meßzylinder, überschichten mit Toluol, absitzen lassen, verdünnen der klaren Anteile auf das 1½fache — angestellt. Ich gebe auch hier zunächst den betreffenden Versuch von *Haehn* und *Berentzen* (S. 300, Tabelle V) wieder und im Anschluß daran die meinen. Die Lösungen wurden, wie vorgeschrieben, 15 Minuten lang kräftig geschüttelt. Wirkungszeit 1 bis 2 bis 3 bis 24 Stunden bei 40° im Wasserbad.

Versuchsnummer:	1	2	3	4
	Reaktionsgemisch in ccm			
Normalsystem	1,5	1,5	1,5	1,5
Amyloselösung	5,0	5,0	5,0	5,0
Wasser	3,5	3,5	3,5	3,5
Jodreaktion . . . . nach Stdn.	1	2	3	24
(mit 3 Tropfen n/10 Jodlösung) (*H.* und *B.*)	violett	braungelb	hellgelb	—
Eigener Versuch	blau	blau	blau	blau

Derartige Versuche habe ich mit drei verschiedenen Präparaten von Kartoffelstärke in genau der gleichen Weise ausgeführt, stets mit demselben negativen Ergebnis. *Das von Haehn und Berentzen erzielte Resultat wurde in keinem einzigen Falle trotz genauester Innehaltung der gegebenen Vorschriften beobachtet, selbst wenn wir die Versuchsdauer bis auf 24 Stunden ausdehnten.*

Es fragt sich nun, wie soll man sich diese Divergenz zwischen *Haehns* Versuchen und den meinigen erklären.

In dem „Normalsystem" kann sie kaum begründet sein. Denn wir haben wie er für die Herstellung der Salzlösung und der Aminosäurenlösung nur *Kahlbaum*sche Präparate und für die Peptonlösung gleichfalls Wittepepton verwandt. Verschieden ist nur die Kartoffelstärke. Es muß demnach in diesem Punkte die Differenz gesucht werden. Nun wissen wir, daß die Herstellung der Kartoffelstärke meist eine so schonende ist, daß sehr wohl noch Spuren von amylolytischem Ferment in ihr vorhanden sein können. Wenn man sich nun nach der Vorschrift von *Biedermann* eine Stärkelösung in so vorsichtiger Weise bereitet, daß man 1,0 g Substanz in 100 ccm Wasser aufschwemmt, nur bis auf 80° erwärmt und dann abkühlen läßt, so sind damit sicherlich nicht alle Fermentspuren beseitigt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß *Haehn* und

Berentzen mit Präparaten arbeiteten, die noch derartige Fermentspuren enthielten, während in meinen Präparaten nichts mehr davon vorhanden war. In dieser Annahme werden wir bestärkt durch eine kurze Bemerkung am Ende der Arbeit von *Haehn* und *Berentzen*, S. 316. Hier heißt es: „Nach unseren vorläufigen Versuchen scheint unser System (vgl. ‚Normalsystem' *T.*) im Sinne *Ostwalds* katalytisch zu wirken; denn *setzt man eine Stärkelösung allein*, jedoch unter Zugabe des Antiseptikums Jodoform an, *so treten auch reduzierende Abbauprodukte auf, jedoch viel weniger, als wenn das Normalsystem zugegeben worden war*[1]) (die dem Stärkepräparat beigefügten geringen Zuckermengen werden natürlich dabei berücksichtigt)." Das besagt doch nichts mehr und nichts weniger, als daß *Haehn* und *Berentzen* mit Stärkelösungen gearbeitet haben, die Spuren von diastatischem Ferment enthalten haben, denn anders ist doch das Auftreten von reduzierenden Abbauprodukten nicht zu erklären. Wenn auf solche Lösung das „Normalsystem" begünstigend wirkt, so ist man unseres Erachtens nicht berechtigt, von einer katalytischen Wirkung zu sprechen, sondern nur von einer aktivierenden. Denn wir haben hier nichts anderes vor uns als die aktivierende Wirkung von Chloriden, die ja längst bekannt ist.

Jetzt wird es auch klar, weshalb wir auf unüberwindliche Schwierigkeiten stießen, die Versuche von *Biedermann* sowohl wie von *Haehn* und *Berentzen* zu reproduzieren. Offenbar arbeiteten wir in der Mehrzahl der Fälle mit Stärkelösungen, die keine Spur von amylolytischem Ferment mehr enthielten. Wenn wir aber mitunter ein positives Resultat bekamen, und wir kochten dann sämtliche für den Versuch erforderlichen Lösungen für sich gesondert und stellten dann die vorgeschriebenen Mischungen her, so haben wir auch in diesen Fällen nur negative Ergebnisse gehabt.

Wir können demnach die Versuche von Haehn und Berentzen nicht für beweisend erachten im Sinne einer „Salzhydrolyse der Stärke". Erst wenn es ihnen gelingt, positive Resultate zu erzielen mit einer Stärkelösung, die vorher so lange gekocht wurde, daß sie bei noch so langer Versuchsdauer für sich allein keine „reduzierenden Abbauprodukte" liefert, und mit einem Normalgemisch, von dem die einzelnen Lösungen für sich ebenfalls anhaltend gekocht wurden zwecks Beseitigung sämtlicher die Klarheit der Versuchsanordnung störender Beimengungen, erst dann wird man sagen können, daß ihnen der Beweis geglückt ist, daß tatsächlich Stärke durch Salze in Gemeinschaft mit Aminosäuren und Pepton nach Art eines diastatischen Ferments hydrolysiert wird.

Dasselbe gilt auch für die Versuche von *Biedermann*. Hier scheint allerdings das von uns aufgestellte Postulat des vorherigen Kochens

[1]) Von mir gesperrt gedruckt. *T.*

bereits erfüllt zu sein. Denn *Biedermann* kocht seine Stärke-Salzlösung 15 Minuten, kühlt sie ab und läßt dann erst den Versuch im Brutschrank vor sich gehen. Aber wie gesagt, diese von ihm geübte Vorsicht ist nur eine scheinbare. Denn im hiesigen Laboratorium hat *Hizume*[1]) gezeigt, daß, wenn man eine Diastaselösung in Gegenwart eines die Diastase aktivierenden Salzes, also z. B. NaCl, KCl, $CaCl_2$ usw., erhitzt, das Ferment vor der Zerstörung durch Hitze geschützt wird. Wenn also *Biedermann* die Stärkelösung mit der Salzlösung erst mischt und dann kocht, so ist bei diesem Vorgehen keineswegs ausgeschlossen, daß nicht doch noch Spuren von Ferment bzw. Proferment in der Stärkelösung erhalten geblieben sind. Erst wenn er, wie wir das getan haben, die Stärkelösung gründlichst (1 Stunde lang) kocht und ebenso mit der Salzlösung verfährt, und wenn er dann die beiden Lösungen vereint, erst dann wäre jedem Einwand die Spitze abgebrochen. *Solange diese Versuchsanordnung, wie wir gezeigt haben, zu einem negativen Resultat führt, ist man nicht berechtigt, von einer „Salzhydrolyse der Stärke" im Sinne eines diastatischen Ferments zu sprechen.*

[1]) *K. Hizume*, diese Zeitschr. **146**, 68, 1924.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H.v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Häggland-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, M. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau.

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundsiebzigster Band

Viertes bis sechstes Heft

Abgeschlossen am 30. August 1926

Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt ℳ 28,—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Das Honorar beträgt ℳ 40,— für den 16 seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

175. Band. Inhaltsverzeichnis. Heft 4/6.

Seite

Rona, Peter und **Margot Sperling.** Untersuchungen über den Blutzucker. X. Mitteilung: Über die Verteilung der Glucose auf Plasma und Blutkörperchen 253

Prát, Silvestr. Die Anwendung der polarographischen Methodik in der Biologie 268

Abelin, I. Zur Kenntnis des Kohlehydratstoffwechsels. I. Mitteilung: Über die Bedeutung des Phosphats für den Umsatz der Kohlehydrate 274

Hägglund, Erik und **Truls Rosenqvist.** Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. V. 293

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Untersuchungen über den Blutzucker.

X. Mitteilung:

Über die Verteilung der Glucose auf Plasma und Blutkörperchen.

Von

Peter Rona und **Margot Sperling.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 8. Juni 1926.)

Der Zweck der vorliegenden Untersuchung war, die Verteilung des Traubenzuckers auf Plasma und Formelemente bei alimentärer Hyperglykämie unter sonst normalen Bedingungen und unter Insulinwirkung zu untersuchen.

I.

Die angewandte Methode war die folgende. Den Kaninchen wurden nach der Nüchtern-Blutentnahme 15 bis 20 g Traubenzucker *„Kahlbaum"*, in etwa 60 ccm Wasser gelöst, mit der Schlundsonde gegeben. Die Versuchspersonen aßen nach der ersten Blutentnahme 125 g Rohrzucker. Sofort nach der Blutentnahme, die in den in den Protokollen angegebenen Zeiträumen erfolgte, wurden die Hämatokritröhrchen mit dem mit FNa versetztem Blute gefüllt und bis zur Volumenkonstanz zentrifugiert. Die Blutentnahme betrug durchschnittlich 1,5 ccm. In dem Plasma und in dem Vollblut wurden der Gehalt an reduzierender Substanz nach der Methode von *Hagedorn-Jensen* bestimmt und der Traubenzuckergehalt der Formelemente aus den Analysenbefunden nach folgender Gleichung berechnet:

$$FZ = \frac{100\,VBZ - PLZ \,.\, Pl\text{-}Vol.}{F\text{-}Vol.},$$

wobei bedeutet:

FZ = Formelementzucker, d. h. Milligramm Zucker in 0,1 ccm Formelemente.
VBZ = Vollblutzucker, d. h. Milligramm Zucker in 0,1 ccm Vollblut.
PLZ = Plasmazucker, d. h. Milligramm Zucker in 0,1 ccm Plasma.
F-Vol. = Prozent Volumenanteil der Formelemente im Vollblut.
Pl-Vol. = Prozent Volumenanteil des Plasmas im Vollblut.

Sämtliche Zahlen in den Tabellen sind Mittelwerte aus zwei gut übereinstimmenden Analysen.

Das Ergebnis der ersten Reihe der Untersuchungen, die die Verhältnisse bei der Hyperglykämie ohne Insulinwirkung prüften, ist in den Tabellen I und II wiedergegeben.

Tabelle I.

Ohne Insulin mit alimentärer Hyperglykämie.

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm			Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
		Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg		
7	Kaninchen 2, 2200 g.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15'	0,113	0,117	0,102	27	12,3
	30 g Glucose in etwa 100 ccm Aq. per Magensonde.					
	2. Blutentnahme 11h00'	0,183	0,221	0,080	27	63,8
	3. „ 11 45	0,217	0,224	0,197	26	12,05
	4. „ 12 30	0,221	0,252	0,101	20,5	59,9
	5. „ 1 15	0,211	0,242	0,145	30,5	39,6
8	Kaninchen 2.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 11h15'	0,114	0,130	0,076	26	41,5
	15 g Glucose in etwa 100 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 12h15'	0,142	0,149	0,117	22	21,5
	3. „ 1 15	0,162	0,173	0,132	27	23,7
	4. „ 2 00	0,198	0,211	0,152	22	28,0
	5. „ 2 45	0,180	0,198	0,108	20	45,5
9	Kaninchen 1, 2500 g.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15'	0,118	0,118	0,118	21	0
	15 g Glucose in etwa 100 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h15'	0,227	0,260	0,138	27	46,9
	3. „ 12 15	0,186	0,219	0,069	22	54,4
	4. „ 1 15	0,158	0,202	0,0018	22	99,8
	5. „ 2 15	0,146	0,176	0,062	26	64,8
12	Kaninchen 1.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 11h15'	0,098	0,114	0,034	20	70,2
	15 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 12h15'	0,193	0,222	0,115	27	48,2
	3. „ 1 00	0,166	0,205	0,022	21,5	89,3
	4. „ 2 00	0,149	0,170	0,078	23	54,1
	5. „ 2 45	0,142	0,161	0,071	21	55,9
13	Kaninchen 2.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15'	0,113	0,128	0,074	26	42,2
	15 g Glucose in 50 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h15'	0,180	0,201	0,119	26	40,8
	3. „ 12 15	0,139	0,168	0,045	23	73,2
	4. „ 1 15	0,136	0,150	0,088	22	41,3
	5. „ 2 30	0,128	0,136	0,100	21	26,5
14	Kaninchen 1.					
	Sicherlich nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30'	0,134	0,172	0,024	25,5	86,0
	15 g Glucose in 15 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30'	0,222	0,266	0,082	27	68,8
	3. „ 12 30	0,216	0,239	0,125	20	60,0
	4. „ 1 30	0,179	0,210	0,065	21,5	69,1
	5. „ 2 30	0,163	0,174	0,130	25	25,3

Tabelle I (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm: Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg	Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
15	Kaninchen 2. Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h00'	0,121	0,139	0,072	27	48,2
	15 g Glucose in 50 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h00	0,213	0,259	0,070	24,25	73,0
	3. „ 12 00'	0,204	0,229	0,136	26,5	40,6
	4. „ 1 15	0,167	0,179	0,128	23,5	28,5
	5. „ 2 30	0,153	0,170	0,102	25	40,0
17	Kaninchen 2. Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30'	0,133	0,149	0,050	16	66,4
	15 g Glucose in 50 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30'	0,230	0,270	0,058	19	78,5
	3. „ 12 45	0,222	0,246	0,106	17	56,9
	4. „ 1 30	0,186	0,205	0,108	19,5	47,3
	5. „ 2 30	0,154	0,182	0,023	17,5	87,4
18	Kaninchen 3, 2300 g. Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30'	0,188	0,214	0,114	26,25	46,7
	15 g Glucose in 50 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30'	0,275	0,331	0,142	29,5	56,8
	3. „ 12 30	0,248	0,286	0,153	28,5	46,2
	4. „ 1 30	0,233	0,271	0,123	26	54,6
	5. „ 2 30	0,181	0,200	0,138	27,5	31,0

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm: Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg	Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
5	Frl. *S.* 8h Tee, ein Butterbrot.					
	1. Blutentnahme 11h50'	0,105	0,123	0,064	30,25	47,9
	125 g Rohrzucker per os.					
	2. Blutentnahme 12h40'	0,093	0,095	0,089	27	6,3
	3. „ 1 15	0,123	0,140	0,096	38,75	3 ,5
11	Frl. *S.* 8h Tee, Butterbrötchen.					
	1. Blutentnahme 11h15'	0,110	0,122	0,083	30,5	32
	125 g Rohrzucker per os.					
	2. Blutentnahme 12h15'	0,126	0,137	0,107	36,5	22
	3. „ 1 00	0,162	0,168	0,149	31,5	11,3
	4. „ 2 00	0,126	0,142	0,077	24,5	45,8
	5. „ 3 00	0,121	0,129	0,103	31,5	20,2

Über die einzelnen Versuche ist folgendes zu bemerken:

Kaninchenversuche.

Protokoll 7. Nach der verhältnismäßig hohen Zuckergabe (30 g Traubenzucker in 100 ccm Wasser) ist 40 Minuten später der Zuckergehalt des Plasmas um fast 100 Proz. des im nüchternen Zustande entnommenen Bluts gestiegen, während der Zuckergehalt der Formelemente sogar zurückgegangen ist (siehe auch Protokoll 15). Bei der dritten Blutentnahme ist auch der FZ stark angestiegen, bei der vierten trotz steigendem PLZ auf den Nüchternwert gefallen. 45 Minuten später ist die Kurvenrichtung umgekehrt: VBZ und PLZ nehmen ab, der FZ zu.

Protokoll 8. Im Verlauf der Hyperglykämie steigt der Zuckergehalt des Plasmas mehr als der der Formelemente. Bei der (physiologischen) Entzuckerung geben die Formelemente den Zucker schneller ab als das Plasma. Daß das Volumenprozent der Formelemente trotz steigendem Zuckergehalt anfangs fällt, wurde an mehreren Fällen beobachtet (vgl. Protokoll 15, 21, 23, 24, 27, 29).

Protokoll 9. 1 Stunde nach der Zuckergabe hat die Hyperglykämie den Höchstpunkt erreicht, wie übrigens in den meisten Versuchen. Bei der vierten Blutentnahme sind die Formelemente fast zuckerfrei (0,0018 Proz.), bei noch andauernder Hyperglykämie. 1 Stunde später ist der Zuckergehalt der Formelemente auf 0,062 Proz. gestiegen, während der PLZ abnimmt.

Protokoll 12. 2 Stunden nach der Zuckergabe ist der FZ um 89,3 Proz. geringer als der PLZ, steigt dann wieder an.

Protokoll 13. Ähnliche Kurve wie Protokoll 9: nach starker Entzuckerung der Formelemente steigt ihr Zuckergehalt wieder, so daß von der dritten Stunde die Kurven für PLZ und FZ konvergieren.

Protokoll 14. Die Zuckeranreicherung in den Formelementen dauert noch in der zweiten Stunde an, während der PLZ schon abnimmt. Die Kurven konvergieren also zwischen der zweiten und dritten Stunde (siehe auch Protokoll 15, 17, 18) und wieder zum Schluß (siehe auch Protokoll 7, 18, 13).

Protokoll 15. Abnahme des Volumenanteils der Formelemente bei steigendem VBZ und fallendem FZ. Erst, während der VBZ nach der ersten Stunde den höchsten Wert erreicht hat und langsam sich verringert, steigt der FZ stark an (s. auch Protokoll 17) und sinkt nach der dritten Blutentnahme.

Protokoll 17. Anstieg des FZ ähnlich wie in Versuch 15; Zuckerabgabe aber in kürzerer Zeit und in größerem Ausmaße als im Plasma.

Protokoll 18. Langsamer Anstieg des FZ; nach Zuckerabgabe in der dritten Stunde steigt der FZ in der vierten Stunde bei fallendem PLZ.

Versuche an Menschen.

Protokoll 5. Der Verlauf der Kurven zwischen erster und zweiter Blutentnahme entspricht den meisten Tierkurven am Ende der alimentären Hyperglykämie. Der Zuckeranstieg im Plasma geht auch hier steiler als in den Formelementen.

Protokoll 11. Der Anstieg der Zuckerkonzentration dauert bis zur dritten Stunde. Dann geben die Formelemente Zucker in großem Ausmaße

ab unter Verminderung ihres Volumenanteils. Sie nehmen aber gleich wieder Zucker auf, so daß zum Schluß die Kurven für PLZ und FZ wieder konvergent sind.

Mensch und Tier (Kaninchen) zeigen, wie aus den mitgeteilten Versuchen ersichtlich, nach der Glucoseaufnahme eine Zunahme des Blutzuckers, die sich in verschiedener Weise auf Plasma und Formelemente verteilt. Immer liegt der Wert für FZ unterhalb des Wertes für VBZ und PLZ, beim Nüchtern- wie auch beim Höchstwert. Der Höchstwert beider Blutbestandteile liegt fast immer 1 Stunde nach der Zuckergabe. Nur bei sehr starker Hyperglykämie und wenn die Nüchternwerte von PLZ und FZ eine große Differenz zeigen, steigt der Blutzucker noch 1 Stunde länger als der PLZ (s. Protokoll 14, 15, 17, 18). Ein zweiter Befund, der bei allen Versuchen der Reihe zu verzeichnen ist, ist, daß der Zuckerzuwachs im Plasma und in den Formelementen nicht gleich ist. Während VBZ und PLZ in steilem Winkel ansteigen, vollzieht sich die Zuckeranreicherung der Formelemente viel langsamer und in geringerem Grade. Beim Abfall der Kurve tritt der umgekehrte Vorgang ein: PLZ und VBZ fallen langsamer als FZ. Die Formelemente geben also in diesen Versuchen den Zucker schneller ab, als sie ihn aufnehmen. Häufig stürzt der FZ-Wert nach einem Maximum steil ab (s. Protokolle 9, 10, 12, 13, 17), geht aber dann, während PLZ und VBZ langsam abnehmen, wieder aufwärts (Protokolle 7, 12, 13, 18).

Die Versuche an Menschen und an Kaninchen weisen keine prinzipiellen Unterschiede des Kurvenverlaufs auf.

II. Verteilung des Zuckers auf Plasma und Formelemente unter Insulin.

A. Nach alimentärer Hyperglykämie.

Die Hyperglykämie wurde wie oben durch Glucoselösung mit der Magensonde erzeugt. 1 Stunde später wurde eine Blutentnahme vorgenommen (zweite Blutentnahme der Protokolle) und gleich danach Insulin subkutan gespritzt. Die übrige Versuchsanordnung war wie oben angegeben.

Kaninchenversuche.

Protokoll 20. Trotz angeblicher Nüchternheit zeigt das Tier wieder einen so hohen Anfangswert wie in Protokoll 18. (Es starb beim nächsten Versuch nach der Zuckergabe.) Die Hyperglykämie ist noch nach der fünften Blutentnahme sehr stark, aber die Verteilung des Zuckers auf Plasma und Formelemente zeigt einen Unterschied gegenüber den Versuchen ohne Insulin: der PLZ ist in den 30 Minuten zwischen vierter und fünfter Entnahme um etwa 10 Proz. gefallen, der FZ gar nicht. Das tritt noch deutlicher bei der letzten Blutentnahme (3½ Stunden nach der Insulingabe) in Erscheinung. Der VBZ entspricht dem Anfangswert; er ist, wie PLZ nach

Tabelle III.

Versuche mit Insulin und alimentärer Hyperglykämie.

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm			Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
		Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg		
20	Kaninchen 3.					
	Angebl. 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h15′	0,193	0,204	0,167	28,75	18,1
	17 g Glucose per os.					
	2. Blutentnahme 10h15′	0,303	0,355	0,176	29	50,4
	0,5 E. Insulin *Tetewop* 10 30					
	3. Blutentnahme 11 00	0,341	0,385	0,248	31,5	35,6
	4. „ 11 30	0,309	0,365	0,174	29,25	52,3
	5. „ 12 00	0,298	0,335	0,174	23	48,1
	6. „ 2 00	0,195	0,188	0,213	27,75	— 13,3
21	Kaninchen 2.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30′	0,106	0,115	0,067	19	41,7
	18 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30′	0,242	0,273	0,091	17	66,6
	1 E. Insulin *Tetewop* subkutan.					
	3. Blutentnahme 12h 00′	0,215	0,236	0,123	18,75	47,9
	4. „ 12 30	0,201	0,217	0,129	18,5	40,5
	5. „ 2 30	0,100	0,088	0,156	17,5	— 61,4
22	Kaninchen 2.					
	Angebl. 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h50′	0,123	0,135	0,082	22	39,4
	15 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 12h15′	0,238	0,258	0,176	24,5	31,8
	1 E. Insulin *Tetewop* subkutan.					
	3. Blutentnahme 1h15′	0,163	0,184	0,080	20	56,5
	4. „ 2 30	0,121	0,105	0,161	23,5	— 53,6
23	Kaninchen 4, 4300 g.					
	Nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30′	0,107	0,137	0,075	31,5	48,8
	15 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30′	0,131	0,144	0,101	26,2	25,7
	0,5 E. Insulin *Kahlbaum*.					
	3. Blutentnahme 12h30′	0,098	0,080	0,146	27	— 82,5
	4. „ 1 30	0,085	0,075	0,112	27	— 49,3
	5. „ 2 30	0,080	0,089	0,054	26	39,3
24	Kaninchen 5, 4200 g.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15′	0,099	0,115	0,058	28,1	49,6
	15 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h15′	0,210	0,232	0,153	27,5	34,1
	1 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	3. Blutentnahme 12h15′	0,135	0,151	0,092	27,25	39,8
	4. „ 1 15	0,105	0,101	0,118	23,4	— 16,8
	5. „ 1 45	0,110	0,131	0,055	27,75	59,9
	6. „ 2 30	0,114	0,129	0,077	28,75	40,3

Tabelle III (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm: Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg	Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
27	Kaninchen 4.					
	Etwa 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h30'	0,099	0,113	0,077	38,5	31,9
	15 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h30'	0,169	0,187	0,117	25,75	37,4
	1,5 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	3. Blutentnahme 12h30'	0,099	0,103	0,088	26,75	14,6
	4. „ 1 30	0,099	0,094	0,114	28,4	— 21,3
	5. „ 2 30	0,113	0,119	0,099	29,5	17,2
29	Kaninchen 4.					
	Angebl. 18 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15'	0,138	0,145	0,121	29	16,5
	20 g Glucose in 60 ccm Aq.					
	2. Blutentnahme 11h15'	0,253	0,295	0,128	25	56,5
	1,5 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	3. Blutentnahme 12h15'	0,150	0,159	0,127	27,5	20,1
	4. „ 1 15'	0,134	0,133	0,136	24,25	— 2,25
	5. „ 2 30	0,088	0,086	0,094	26	— 9,3

dem Höchststand der Hyperglykämie, kontinuierlich gefallen. Aber der Zuckergehalt der Formelemente ist gestiegen, so daß sie zuckerreicher als Vollblut und Plasma sind; ein Befund, der in den Versuchen ohne Insulin nie zu verzeichnen war, aber bei ausgesprochener Insulinwirkung konstant auftritt.

Der prozentuale Volumenanteil der Formelemente verringert sich zwischen der dritten und fünften Blutentnahme (½ bis 1½ Stunden nach Insulingabe) von 31,5 bis 23, am meisten zwischen vierter und fünfter, obgleich der FZ gleichbleibt.

Protokoll 21. Der FZ steigt ständig, während PLZ und VBZ nach der Insulingabe steil abfallen, steiler als bei der Entzuckerung ohne Insulin. So ist zum Schluß (2 Stunden nach der Insulingabe) der FZ doppelt so hoch, aber der PLZ um etwa 23 Proz. geringer als im Nüchternwert. Die Glucosekonzentration ist also um 61 Proz. höher als im Plasma.

Protokoll 22. Der FZ fällt zunächst wie in den Versuchen ohne Insulin beim Abklingen der Hyperglykämie, steigt dann aber über den VBZ und PLZ.

Protokoll 23. Die verhältnismäßig kleine Glucosegabe (etwa 3,5 g auf 1 kg Tier) hat nur eine geringe Hyperglykämie zur Folge. Die Entzuckerung nach Insulin wäre kaum von der physiologischen zu unterscheiden, wenn nicht nach der Insulingabe bis zur dritten Stunde der FZ den PLZ um einen bedeutenden Prozentsatz übertreffen würde. Zum Schluß des Versuchs steigt der Plasmazucker wieder an (siehe auch Protokolle 24, 28, 27, 30, 31).

Protokoll 24. Auch hier ein Verlauf der FZ-Kurve, der ähnlich bei den Versuchen ohne Insulin vorkommt (z. B. Protokoll 12), aber nicht unterhalb der PLZ-Kurve bleibt wie dort, sondern sich mit ihr kreuzt (vierte Blutentnahme 2 Stunden nach Insulingabe). Die Richtung der Volumenprozent-

kurve der Formelemente entspricht nach Insulingabe der PLZ-Kurve (siehe auch Protokolle 21, 33), d. h. mit steigender Blutkonzentration (Flüssigkeitsabgabe aus dem Blute) ist in dem Plasma eine Zuckerkonzentrationssteigerung. Dies ist aber sowohl ohne wie mit Insulin der seltenere Befund am Schluß der Versuche (siehe hingegen Protokolle 9, 11, 12, 14, 20, 22, 35, 39, in denen der FZ steigt mit steigendem Volumenprozentanteil der Formelemente, während der PLZ fällt).

Protokoll 27. Auch hier ausgesprochen mehrphasiger Verlauf der FZ-Kurve mit Überschneidung der PLZ-Kurve bei der vierten Blutentnahme. Bei diesem Versuchstier vermindert sich stets nach der ersten Blutentnahme der Volumenprozentanteil der Formelemente trotz steigendem Plasmazucker, was bei Tier 2 auch manchmal beobachtet wurde.

Protokoll 29. Der FZ steigt kaum während der Dauer der Hyperglykämie, geht dann aber in der zweiten Stunde nach Insulingabe bei fallendem PLZ aufwärts, um dann gemeinsam mit dem PLZ abzusinken. Ob hier die Verteilungswirkung des Insulins durch die hohe Zuckergabe vermindert oder aus dem gleichen Grunde die Insulinwirkung in größerem Ausmaße erst später auftritt, sei dahingestellt.

B. Verteilung des Zuckers auf Plasma und Formelemente unter Insulinwirkung ohne experimentelle Hyperglykämie.

a) Versuche an normalen Kaninchen.

Die Versuche wurden an nichtnüchternen Tieren ausgeführt (etwa 2 Stunden nach der Fütterung), um toxische Wirkungen des Insulins zu vermeiden. Nach der ersten Blutentnahme wurden 0,5 bis 1,5 Einheiten Insulin subkutan gespritzt. Außer einer leichten Dyspnoe wurden selbst bei ausgesprochener Hypoglykämie keine Symptome des Hyperinsulinismus beobachtet.

Protokoll 28. Der VBZ sinkt kontinuierlich, der PLZ sinkt bis zur letzten Blutentnahme, um hier um mehr als 10 Proz. zu steigen. Dem Plasma entgegengesetzt verhalten sich die Formelemente: ihr Zuckergehalt steigt bis zur dritten Stunde nach der Insulingabe; dann geben sie in stärkerem Maße Zucker ab, ähnlich wie nach der Hyperglykämie in Protokollen 7, 9.

Protokoll 30. 1 Stunde nach der Insulingabe hat der Zuckergehalt beider Blutkomponenten erheblich abgenommen, aber der der Formelemente weniger als der des Plasmas, so daß die Kurven sich wieder kreuzen. Der Wert des Plasmazuckers ist bei der zweiten Blutentnahme gleich dem bei der dritten. Trotz steigender VBZ-Werte und kaum veränderten Hämatokritwerten; die Abnahme der Hypoglykämie ist also lediglich dem ansteigenden FZ zuzuschreiben. Das dauert aber nur bis zur nächsten Blutentnahme. Dann wird das Verteilungsverhältnis wieder ähnlich dem ohne Insulin.

Protokoll 33. Bis zur dritten Blutentnahme (2 Stunden nach der Insulingabe) nimmt PLZ und VBZ und auch der FZ ab. Das Verhältnis von PLZ und FZ ist großen Schwankungen unterworfen, so daß die Kurven sich in jeder Stunde wieder schneiden. Am Schluß des Versuchs steigt PLZ und VBZ und der FZ fällt.

Tabelle IV.

Versuche mit Insulin ohne alimentäre Hyperglykämie.

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm: Vollblut mg	Glucose in 0,1 ccm: Plasma mg	Glucose in 0,1 ccm: Formelemente mg	Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
	a) Bei Kaninchen.					
28	Kaninchen 5.					
	Nicht nüchtern (?).					
	1. Blutentnahme 10h20'	0,108	0,128	0,066	32	48,4
	0,5 E. Insulin *Kahlbaum* subk. *).					
	2. Blutentnahme 11h30'	0,097	0,105	0,078	27,5	25,7
	3. „ 12 30	0,090	0,088	0,096	24,5	— 9,1
	4. „ 2 00	0,083	0,103	0,019	23,75	81,6
30	Kaninchen 5.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h20'	0,121	0,129	0,093	22,5	27,9
	1 E. Insulin *Kahlbaum* subk. **).					
	2. Blutentnahme 11h20'	0,057	0,055	0,064	22,5	— 16,5
	3. „ 12 20	0,064	0,055	0,096	22	— 74,5
	4. „ 1 20	0,081	0,088	0,053	20	39,8
	5. „ 2 30	0,097	0,112	0,044	21,9	60,7
33	Kaninchen 5.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h45'	0,115	0,122	0,096	25,1	21,2
	1,5 E. Insulin *Kahlbaum* subk. ***).					
	2. Blutentnahme 10h45'	0,045	0,043	0,051	24,3	— 18,6
	3. „ 11 45	0,033	0,038	0,015	21,25	60,5
	4. „ 12 45	0,051	0,042	0,086	22	−105
	5. „ 2 00	0,058	0,065	0,035	23,25	46,2
34	Kaninchen 2, 2200 g.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h45'	0,112	0,119	0,084	20,25	29,4
	0,5 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	2. Blutentnahme 11h45'	0,041	0,036	0,062	19,5	— 72,2
	3. „ 12 45	0,027	0,019	0,066	17,25	−247,0
	4. „ 1 45	0,022	0,026	0,004	18,15	84,6
	5. „ 2 30	0,053	0,047	0,091	13,75	— 93,5
35	Kaninchen 4, 4300 g.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 10h15'	0,109	0,112	0,100	24	20,0
	1,5 E. Insulin subkutan.					
	2. Blutentnahme 11h15'	0,079	0,076	0,072	23	5,25
	3. „ 12 15	0,069	0,062	0,091	21,9	— 44,4
	4. „ 1 15	0,077	0,065	0,114	24,4	— 56,9
	5. „ 2 15	0,085	0,092	0,060	22	34,8

*) D. h. 0,12 E. pro kg Körpergewicht.
**) D. h. 0,24 E. „ „ „
***) D. h. 0,36 E. „ „ „

Tabelle IV (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm			Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Serum
		Vollblut mg	Plasma mg	Formelemente mg		
	b) Bei normalen Menschen.					
36	Dr *B.*, etwa 60 kg.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h50′	0,104	0,107	0,100	40	6,54
	3 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	2. Blutentnahme 10h50′	0,083	0,088	0,074	34,25	15,9
	3. „ 11 20	0,084	0,088	0,076	31,25	13,6
	4. „ 12 20	0,076	0,083	0,063	35,25	24,1
37	Dr. *L.*, etwa 80 kg.					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h50′	0,119	0,123	0,110	34,25	10,6
	4 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	2. Blutentnahme 10h35′	0,094	0,103	0,077	34	25,2
	3. „ 11 35	0,093	0,102	0,077	36	24,5
	4. „ 1 05	0,091	0,099	0,077	36,25	22,2
38	Dr. *A.*					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h55′	0,086	0,094	0,068	30,5	27,7
	5 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	2. Blutentnahme 10h25′	0,086	0,082	0,094	33	— 14,6
	3. „ 11 10	0,076	0,082	0,065	34,1	20,7
	4. „ 12 40	0,072	0,076	0,063	29,25	17,1
39	Dr. *L.*					
	Nicht nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h45′	0,117	0,128	0,098	36,2	23,4
	6 E. Insulin *Kahlbaum* subkutan.					
	2. Blutentnahme 10h15′	0,107	0,107	0,107	29,2	0
	3. „ 11 40	0,091	0,094	0,084	30,5	10,6
	4. „ 1 10	0,096	0,090	0,107	36,2	— 18,9
	c) Versuche an diabetischen Patienten.					
19	Pat. *M.*, 16 Jahre, 30. I.					
	Kein Zucker im Urin, keine Acidose. Ikterus.					
	Etwa 15 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h25′	0,502	0,572	0,369	33	35,5
	20 E. Insulin Welcome 9 30					
	2. Blutentnahme 10 00	0,502	0,572	5,353	31,75	38,3
	3. „ 10 45	0,341	0,356	0,307	30	13,75
25	Pat. *M.*, 16 Jahre, 31. III.					
	Kein Zucker im Urin, keine Acidose.					
	Etwa 15 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 9h15′	0,417	0,460	0,326	32,25	29,1
	20 E. Insulin Welcome subkutan.					
	2. Blutentnahme 10h15′	0,394	0,409	0,363	32	11,25
	3. „ 10 50	0,347	0,319	0,403	33,25	— 26,3

Tabelle IV (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7
Protokoll-Nr.	Versuchsanordnung	Glucose in 0,1 ccm: Vollblut mg	Glucose in 0,1 ccm: Plasma mg	Glucose in 0,1 ccm: Formelemente mg	Das Blut enthält Formelemente Vol.-Proz.	Die Glucosekonz. ist in den Formelementen um Proz. gering. als im Plasma
31	Pat. *M.*, 16 Jahre, 15. IV. Kein Zucker im Urin, keine Acidose. Etwa 15 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 8h50'	0,325	0,345	0,291	37,75	15,7
	20 E. Insulin *Gans*					
	2. Blutentnahme 9h50'	0,323	0,325	0,319	38,25	1,85
	3. „ 10 40	0,293	0,355	0,179	35,25	49,6
26	Herr *Sch.*, 60 Jahre, 30. III. Urinzucker: 0,6 Proz. Keine Acidose. Etwa 15 Stdn. nüchtern. Vorher Gemüsetag.					
	1. Blutentnahme 9h15'	0,204	0,255	0,100	33	60,8
	10 E. Insulin *Welcome* 9 20					
	2. Blutentnahme 10 20	0,255	0,231	0,235	29	— 1,73
	3 „ 11 50	0,163	0,149	0,190	34,25	— 27,5
32	Herr *Sch.*, 60 Jahre, 15. IV. Urinzucker: 0,5 Proz. Keine Acidose. Etwa 15 Stdn. nüchtern.					
	1. Blutentnahme 8h45'	0,195	0,203	0,177	30	12,8
	10 E. Insulin *Welcome* subkutan.					
	2. Blutentnahme 9h50'	0,105	0,113	0,081	25	28,3
	3. „ 10 35	0,109	0,066	0,206	31	—212,0

Protokoll 34. Die (auf das Kilogramm Körpergewicht berechnete) gleiche Insulinmenge wie in Protokoll 30 ruft bei dem kleinen Tiere eine viel stärkere Hyperglykämie hervor. Der VBZ fällt bis nach der vierten, der PLZ bis nach der dritten, der FZ bis nach der zweiten Blutentnahme. Bemerkenswert ist die hochgradige Entzuckerung der Formelemente bei der vierten und die noch stärkere Zuckeraufnahme bei der fünften Blutentnahme. Auch hier zeigt der Verlauf der FZ-Kurve starke Zacken (siehe auch Protokolle 9, 7, 12, 14, 22, 24, 30, 33). Trotz der besonders heftigen Hypoglykämie bei kleiner Menge an Formelementen zeigt das Tier außer einer leichten Dyspnoe in der zweiten bis vierten Stunde keine sogenannten Hyperinsulinismus-Symptome.

Protokoll 35. Die hypoglykämische Insulinwirkung ist (wie immer bei diesem Tier, siehe auch Protokolle 23, 27, 29) während der Versuchsdauer gering und dauert nur bis nach der zweiten Stunde. Auch die Verschiebungswirkung tritt erst bei der dritten Blutentnahme hervor (Tier 5, das gleich groß ist, zeigt diese Wirkung bei gleicher Insulindosis schon nach der zweiten Entnahme).

Die wesentlichsten Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind schon bei der Erläuterung der Protokolle hervorgehoben. Beachtens-

wert scheint ein Vergleich der Protokolle 28, 30 und 33; das gleiche Tier wurde mit steigenden Insulindosen gespritzt. Bei 0,12 Einheiten pro Kilogramm Tier steigt der FZ bis nach der dritten Blutentnahme und fällt dann wie in den Hyperglykämieversuchen ohne Insulin; übersteigt aber an einer Stelle — im Gegensatz zu den Versuchen ohne Insulin — den PLZ. Bei der doppelten Insulinmenge vermindert sich zuerst, wie PLZ und VBZ, auch FZ, aber in geringerem Maße; dann tritt eine starke Zuckeranreicherung in den Formelementen ein, die über den Anfangswert (2 Stunden nach der Fütterung) hinausgeht. Bei den nächsten Blutentnahmen nimmt der FZ ab, bedeutend stärker als anfangs. Die dreifache Insulinmenge läßt den FZ bis zur dritten Stunde (nach der dritten Blutentnahme) abnehmen, erzeugt also eine Hypoglykämie in beiden Blutkomponenten. Aber dann tritt, wie in der vorhergehenden Kurve, eine Anreicherung ein, die den FZ auf 105 Proz. gegenüber dem PLZ vermehrt. Bei der letzten Blutentnahme ist der FZ wieder weit unter den PLZ gesunken.

b) Die Versuche an normalen Menschen.

Es wurden nach der Nüchternblutentnahme (etwa 2 bis 3 Stunden nach einem leichten Frühstück) 3 bis 6 Einheiten Insulin subkutan gespritzt und das Blut in gewissen Zeitabständen wie in den vorigen Versuchen untersucht.

Protokoll 36. Daß die Verschiebungswirkung nicht beobachtet wird, kann an der kleinen Insulinmenge (etwa 0,05 Einheiten auf 1 kg Körpergewicht) oder daran, daß diese Wirkung in die erste Stunde fällt (siehe auch Protokolle 38 und 39), liegen. Der VBZ von 0,076 ist wohl auf die Insulinwirkung zurückzuführen.

Protokoll 37. Kurve ähnlich wie Protokoll 36. Die Insulinmenge ist ebenfalls 0,05 Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht. Die Entzuckerung dauert bei *B.* länger als bei *L.*

Protokoll 38. Die hypoglykämische Wirkung prägt sich im Plasma aus, da die Entzuckerung der Formelemente nur geringgradig ist. ½ Stunde nach der Insulingabe ist der VBZ unverändert, der PLZ gefallen und dementsprechend der FZ so gestiegen, daß er die Kurve des PLZ und des VBZ überkreuzt: die an allen Kaninchenversuchen beobachtete Verschiebungswirkung.

Protokoll 39. Der gleichen Versuchsperson wie in Protokoll 37 wurde 50 Proz. Insulin mehr gespritzt. Der PLZ hat in gleichem Maße wie oben schon nach 30 Minuten abgenommen, hingegen ist der FZ um 10 Proz. gestiegen.

Wenn man die Insulinmengen pro Kilogramm Körpergewicht in Rechnung stellt und beachtet, daß im Tierversuch mit viel größeren Dosen gearbeitet wurde, kann man das Ergebnis der Menschen- und der Tierversuche als gleichsinnig bezeichnen.

c) Versuche an Diabetikern.

Protokoll 19. Patient 16 Jahre. Schwerer jugendlicher Diabetes. Vor etwa 14 Tagen Aufnahme in präkomatösem Zustand mit schwerer Acidose und Glycosurie. Unter großen Insulindosen (bis 150 Einheiten pro Tag) besserte sich der Zustand schnell. Verschwinden der Acidose und keine Zuckerausscheidung im Harn. Die Differenz zwischen PLZ und FZ ist groß, aber prozentual nicht höher als in vielen anderen Versuchen (siehe Protokoll 11). Unter Insulineinwirkung sinkt auch hier der PLZ viel stärker als der FZ.

Protokoll 25. Derselbe Patient wie in Protokoll 19, 2 Monate später. Er erhält dreimal 20 Einheiten pro Tag. Der Nüchtern-BZ ist gegenüber dem vorigen Versuch vermindert, geht aber durch Insulingabe nicht stärker zurück. Bemerkenswert ist das völlig andere Verhalten des FZ: im Protokoll 19 geht er zurück, hier steigt er bei fallendem PLZ, so daß nun auch die Kurvenüberschneidung wie bei normalem Tier und Mensch eintritt.

Protokoll 31. Der gleiche Patient wie Protokoll 19 und 25. Während der VBZ fällt, ist der PLZ bei der dritten Blutentnahme über den Ausgangspunkt gestiegen, der FZ schon bei der zweiten Blutentnahme.

Protokoll 26. Seit 2 Jahren besteht Diabetes. Es ist bemerkenswert, daß 1 Stunde nach Insulingabe der VBZ gestiegen ist. Man würde an Nahrungsaufnahme denken, wenn nicht der PLZ sich um 10 Proz. vermindert hätte. Es ist dementsprechend eine starke Zuckeraufnahme der Formelemente nachweisbar. Zum Schluß tritt eine Entzuckerung beider Blutkomponenten ein, die aber, wie in vielen Tierversuchen, in den Formelementen weniger stark sich auswirkt, so daß die Kurven sich noch stärker gegeneinander verschieben (siehe auch zweite Blutentnahme bei Potokollen 30, 33, 34).

Protokoll 32. Gleicher Patient wie in Protokoll 26, etwa 1 Stunde nach der Insulingabe ist der Zuckergehalt der Blutkomponenten beinahe normal. Dann erst tritt die Verschiebungswirkung in außerordentlich starkem Maße ein.

Beim Vergleich der Versuche mit und ohne Insulin sind zwei prinzipielle Unterschiede zu verzeichnen.

1. Die Entzuckerung wird durch Insulin beschleunigt. Während in Tabelle I und II der Abfall des PLZ und VBZ langsam vor sich geht, fällt der VBZ und PLZ unter genügender Insulingabe schnell, wie es allgemein bekannt ist.

2. Der Verlauf und die Lage der FZ-Kurve verändert sich unter Insulinwirkung. Nach der Zuckergabe ohne Insulin konnte festgestellt werden, daß die Formelemente den Zucker schneller abgeben, als sie ihn aufnehmen, d. h. bestrebt sind, sich vom reduzierenden Material zu befreien. Doch fällt auf, daß nach einer starken Entzuckerung stets wieder eine bedeutende Zuckeraufnahme eintritt, obgleich gleichzeitig VBZ und PLZ sinken. Eine Erklärung dieses Vorgangs dürfte der Kurvenverlauf des FZ nach Insulin liefern. Denn bei kleinen Insulindosen (s. Protokolle 28, 38, 39) fällt wohl der VBZ und PLZ, der FZ steigt aber. Ferner wurde darauf hingewiesen, daß bei hochgradiger Hyperglykämie, wenn die Anfangs-(Nüchtern- oder Normal-)Werte

von PLZ und FZ große Unterschiede zeigen, der FZ noch etwa 1 Stunde länger als der VBZ und PLZ zunimmt. Möglicherweise haben wir es hier mit der Wirkung des endogenen Insulins zu tun (1).

Einen weiteren Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne Insulin bietet die Lage der FZ-Kurve zur PLZ-Kurve. Ohne Insulin ist der PLZ immer höher als der FZ. Insulin bewirkt eine Veränderung der Zuckerverteilung innerhalb des Blutes; die Formelemente werden zuckerreicher als das Plasma. Diese Angaben sind eine Bestätigung der wichtigen Arbeiten von *Loewi* und *Häusler* (2). Daß am Schluß der Insulinkurven bei ansteigendem PLZ der FZ fällt, kann ungezwungen auf ein Abklingen der Insulinwirkung zurückgeführt werden.

Am wenigsten einheitlich ist das Verhalten der Volumenanteile der Formelemente und des Plasmas. Im allgemeinen steigt mit steigendem FZ der Volumenanteil der Formelemente. Auch hier finden sich aber sehr viele Ausnahmen. Dennoch läßt sich für die Mehrzahl der Versuche eine Beziehung zwischen Insulin und Volumenanteil der Blutkomponenten ableiten. Wenn man nämlich den Anstieg des FZ bei fallendem PLZ betrachtet [wie beim Abklingen der Hyperglykämie, Protokolle 9, 11, 7, 18, 12 (4. Blutentnahme), 14; auch nach Insulingabe, Protokolle 20, 22, 27 (4. Blutentnahme), 25, 32, 39], bemerkt man fast immer eine Vergrößerung des F-Volumenanteils. Demnach würde möglicherweise das Insulin bei endogener wie bei exogener Provenienz das Blut eindicken. Bei verhältnismäßig großen Mengen, wie im Tierversuch, tritt eine starke Entzuckerung beider Blutkomponenten ein, und hierbei eine Zunahme des Plasmavolumens [Protokolle 33 (2. und 3. Blutentnahme), 34 (2. und 3. Blutentnahme), 20 (3. und 4. Blutentnahme), 22 (3. Blutentnahme)].

Zusammenfassung.

I. Alimentäre Hyperglykämie ohne Insulin.

1. Bei allen Versuchen ist der Formelementzucker geringer als Plasmazucker und Vollblutzucker.

2. In allen Versuchen steigen der Plasmazucker und Vollblutzucker steiler als der Formelementzucker.

3. Der Anstieg des Formelementzuckers geht flacher als der Abstieg, d. h. die Formelemente geben den Zucker schneller ab, als sie ihn aufnehmen.

4. Häufig sinkt die Formelementzucker-Kurve von einem Höchstwert steil ab und steigt darauf wieder an.

5. Die Versuche an Tieren (Kaninchen) und an Menschen stimmen prinzipiell überein.

II. Entzuckerung durch Insulin.

1. Plasmazucker und Vollblutzucker werden niedriger als der Nüchtern- bzw. normale Zuckerwert, der Formelementzucker höher. Dabei steigt der Gehalt der Formelemente an Zucker über den des Plasmas; ein Befund, der bei den Fällen ohne Insulin nie beobachtet wurde. Dieser in vivo gemachte Befund der „Verteilungswirkung" des Insulins stimmt mit den Angaben von *O. Loewi* und *H. Häusler* über die Wirkungsweise des Insulins extra corpus auf die Verteilung der Glucose auf Blutkörperchen und flüssiges System überein.

2. Beim Abklingen der Insulinwirkung fällt der Formelementzucker, während Vollblutzucker und Plasmazucker ansteigen.

3. Geringe Insulinmengen vermehren den Volumenanteil der Formelemente, große vermindern ihn.

Literatur.

1) Vgl. hierzu *Ege, Gottlieb* und *Rakestraw*, Amer. Journ. of Phys. **72**, 1924. — 2) *H. Häusler* und *O. Loewi*, Pflügers Arch. **210**, 238, 1925; ferner diese Zeitschr. **156**, 295, 1925; *H. Häusler* und *O. Heesch*, Pflügers Arch. **210**, 545, 1925; *H. Häusler* und *R. Margarido*, ebendaselbst **210**, 566, 1925; vgl. besonders auch *Wiechmann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 462, 1924. Vgl. auch *Zondek* und *Ucko*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **148**, 111, 1925.

Die Anwendung der polarographischen Methodik in der Biologie.

Von

Silvestr Prát.

(Pflanzenphysiologisches Institut der tschechischen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 21. Mai 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Als *Kučera* im Jahre 1903 seine Untersuchungen über Elektrokapillarität publizierte, konnte niemand ahnen, daß die „tropfende Kathode" als eine der feinsten elektrochemisch-analytischen Methoden sich dadurch auch für die Biologie als höchst aussichtsvoll bewähren würde. Nach den Publikationen von *Heyrovsky* und seinen Mitarbeitern kann man aber schon die Vorteile der neuen Methode schätzen. *Heyrovský* und *Herasymenko* haben auf die Möglichkeit hingewiesen, die Konzentration der Wasserstoffionen (schwacher Säuren) polarographisch zu messen. An mehreren Stellen macht *Heyrovský* auch darauf aufmerksam, daß ein Polarogramm uns am besten über die Verunreinigungen der Salze informieren kann. Abgesehen von der Durchströmung mit Wasserstoff, die man über Nacht anstellen kann, können wir in 20 Minuten nicht nur über die qualitative, sondern auch (wenigstens annähernd) über die quantitative Zusammensetzung orientiert werden, und zwar in 10 ccm der Lösung. Da die Wellen bei der Verdünnung 10^{-5} Grammäquivalent gut meßbar oder wenigstens noch deutlich sind, kann man auch die Konzentrationen quantitativ feststellen, wo manchmal qualitative Reaktionen schwer oder nicht direkt durchführbar sind. Die Methodik ist in den Abhandlungen von *Heyrovský* und von *Heyrovský* und *Shikata* beschrieben und der Zweck dieser Zeilen ist nur, die Biologen auf die weiteren Anwendungsmöglichkeiten aufmerksam zu machen.

Ich glaube, daß wir über die Dosierung des Eisens und über die quantitativen Beziehungen des Eisens zur Pflanze nur deswegen so mangelhaft orientiert sind, weil die quantitative Feststellung der kleinen Eisenkonzentrationen sehr schwierig oder sogar unmöglich ist. Die leichte Oxydierbarkeit und Hydrolysierbarkeit der Eisenverbindungen

verursacht, daß wenigstens ein Teil des Eisens ausgefällt wird oder wenigstens in kolloidale Lösung übergeht. Das geschieht jedenfalls immer in allen Pflanzennährlösungen, wo Phosphate und Reaktion der Lösung mitwirken. Bei der kolorimetrischen Eisenbestimmung, die man als die empfindlichste quantitative Eisenbestimmung betrachten muß, wird der Lösung Salzsäure zugegeben, die das Eisen wieder in Lösung bringt, und es wird kolloidal gelöstes Eisen (mit wirklich gelöstem) mitbestimmt. Die polarographische Analyse ermöglicht aber die Bestimmung des Eisens, das sich in wirklich gelöster Form vorfindet. Abb. 1 zeigt die polarographische Kurve der halbverdünnten *Knopp*schen Nährlösung, der etwa $1 \cdot 10^{-4}$ mol. $FeSO_4$ zugegeben wurde. Die Höhe der Welle gibt kleinere Quantität an, und wirklich wurde nach 24 Stdn. am Boden ein willkürlicher, ganz deutlicher Niederschlag gebildet. Da bei zehnfacher Verdünnung dieser Lösung (10^{-5} Fe) die Welle nicht 10 mal niedriger ist, sondern vollständig verschwindet, muß man annehmen, daß bei dieser Verdünnung alles Eisen nur kolloidal gelöst vorhanden war.

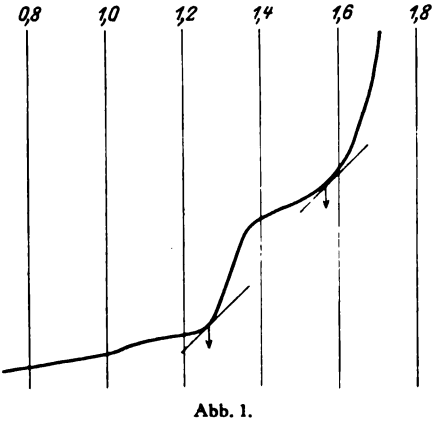


Abb. 1.
$FeSO_4$ $1 \cdot 10^{-4}$ in halbverdünnter *Knop*scher Nährlösung. Eisenwelle und Nitratwendung.

Ich hatte die Absicht, die Beziehungen der aufgenommenen Bleimenge zum Pflanzenwachstum zu beobachten. Wenn man aber Bleichlorid der Nährlösung zugibt, genügen die vorhandenen Phosphate und Sulfate, das Blei so vollständig zur Ausfällung zu bringen, daß die qualitative Reaktion (S'') negativ war. Das Polarogramm dieser Lösung zeigt aber eine eben noch deutliche Bleiwelle. (Einige Angaben über die Löslichkeit von $PbSO_4$ in Sulfaten und in H_2SO_4 bringt *Gosman*.) Die in dieser Lösung vorhandene Bleimenge ist aber jedenfalls allzu gering, um beabsichtigte Versuche anzustellen. Die Lösungen von Bleichlorid in Wasser oder in 0,01 mol. $CaCl_2$ ergaben aber interessante Resultate, über die später berichtet werden soll.

Abb. 2 ist die direkte Reproduktion eines Polarogramms von 0,01 mol. $CaCl_2$ mit 0,0001 mol. $Ca(NO_3)_2$ und $CaCl_2$ in derselben Konzentration mit nur 0,000 01 mol. $Ca(NO_3)_2$. Die Vergleichung der Wellen zeigt deutlich, daß in bestimmten Fällen die quantitative Bestimmung oder wenigstens Schätzung der Nitrate möglich ist, und zwar auch in Konzentrationen, wo die Diphenylaminreaktion der großen Verdünnung wegen nicht direkt durchführbar ist.

Da die polarographische Analyse namentlich bei den niederen Ausscheidungspotentialen am leichtesten durchführbar und sehr genau ist, ist sie für toxikologische Untersuchungen (Cu, Bi, Sb, Pb, Sn, Cd, Ni, Co, Cr), sowie für Stimulationsforschungen (Zn, Mn) sehr vorteilhaft. Dasselbe kann diese Methodik auch bei den Aschenanalysen leisten. Schon die erste Aufnahme kann auf die Elemente, die sehr leicht übersehen werden könnten, aufmerksam machen, und andererseits kann man bei Ab-

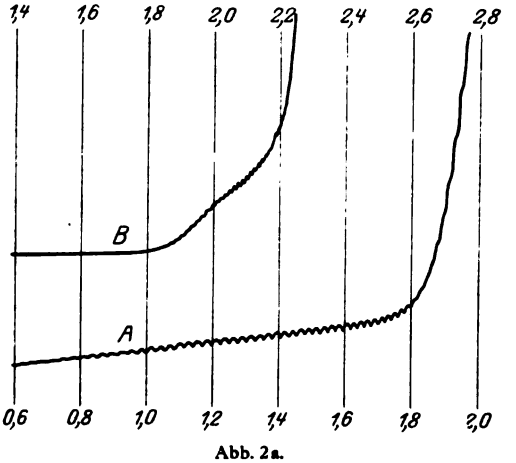


Abb. 2a.

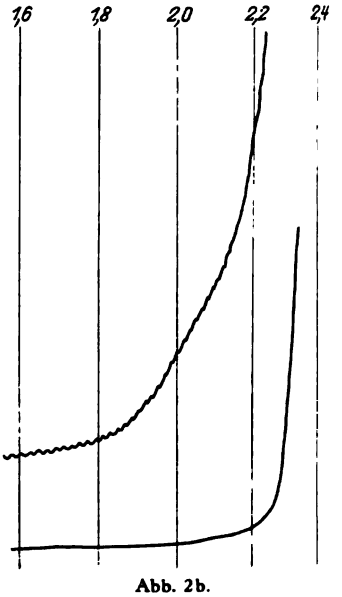


Abb. 2b.

Direkte Reproduktion eines Polarogramms von 0,01 mol. $CaCl_2$ mit 0,0001 mol. $Ca(NO_3)_2$. 2a 0,01 mol. $CaCl_2$ mit 0,000 01 mol. $Ca(NO_3)_2$. *A* bei maximaler Sensitivität, *B* bei $^1/_{10}$ Sensitivität.

wesenheit bestimmter Wellen im Polarogramm mit Sicherheit annehmen, daß die betreffenden Elemente nicht vorhanden sind. Es ist sehr schwer, einen allgemeinen Analysengang zu empfehlen, da meistens nach der ersten orientierenden Aufnahme individuelle Verdünnungen usw. vorbereitet werden müssen, es können aber folgende Beispiele angeführt werden: Die Asche von Chara hispida wurde in n/10 HCl (1 Teil der Asche in 100 Teilen HCl) gelöst (Aufbrausung), die Kohle abfiltriert und das Filtrat 10 mal, 100 mal und 1000 mal verdünnt. Die konzentrierte Lösung wurde nicht polarisiert. Die erste Welle in der höchsten angewandten Konzentration (1 : 1000) gibt Fe an. Da in der 1000fachen Verdünnung (1 Teil Asche in 10 000 Teilen der Lösung) die Säure schon so viel verdünnt wurde, daß das Eisen hydrolytisch ausgeschieden verschwand (an den Verschiebungen des Wendepunkts bei der Verdünnung zu beobachten), erscheint nur die Manganwelle, und zwar noch 13 cm hoch. Wässeriges Dekokt derselben Asche

(1 g in 100 ccm H_2O) lieferte eine Kurve, die ergibt, daß nichts von Fe und Mn in die wässerige Lösung übergeht. Die Wendung bei 1,89 zeigt eine kleine Menge reduzierbarer Stoffe, bei ein Zehntel Sensitivität eine flache Welle, die etwa 10^{-4} Nitrate angibt. Die Reaktion mit Diphenylamin wurde erst nach vollständiger Abdampfung der Lösung deutlich. Ähnliche Resultate wurden auch mit der Asche von den Samen von Beta und von der Lösung des Travertins von Chantransia incrustans erhalten.

Dabei können wir aber nicht leugnen, daß diese Methode eben bei den physiologisch wichtigsten Elementen — Alkalien und alkalischen Erden — selten anwendbar ist. Die Schwierigkeit liegt daran, daß alle

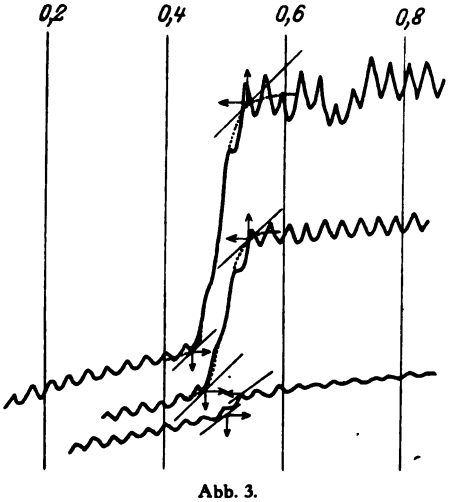


Abb. 3.

Bleiwellen. Verschiedene Konzentrationen von $PbCl_2$ in 0,01 mol. $CaCl_2 . PbCl_2$ $1 . 10^{-4}$, $5 . 10^{-5}$, $1 . 10^{-5}$.

diese Elemente sehr hohe Ausscheidungspotentiale besitzen, vielleicht in der Natur immer beisammen vorhanden sind, sich überdecken und auch mit Wasserstoffausscheidung interferieren können. Die Hoffnung, zwischen organischen Verbindungen (Aminen und Sulfinjodiden) komplexe Kationen mit höheren Ausscheidungspotentialen zu finden, hat sich bisher nicht bestätigt.

Es möchte noch angeführt werden, daß auch bei verschiedenen quantitativen Studien (Permeabilität usw.) mit Alkaloiden oder anderen organischen Substanzen (leicht adsorbierbaren), von welchen einige sehr charakteristische Ausscheidungskurven haben, die polarographische Analyse das beste leisten kann. Auf die Fälle der natürlichen Wässer, der Bodenextrakte, Pflanzensäfte und auch der tierischen Körper-

flüssigkeiten, wo manchmal nur die Feststellung genügt, ob in verschiedenen Zeiten oder unter bestimmten Bedingungen entnommene Proben in ihrer Zusammensetzung gleich sind oder abweichen, braucht nicht näher eingegangen zu werden; es ist auch in den Fällen nütz-

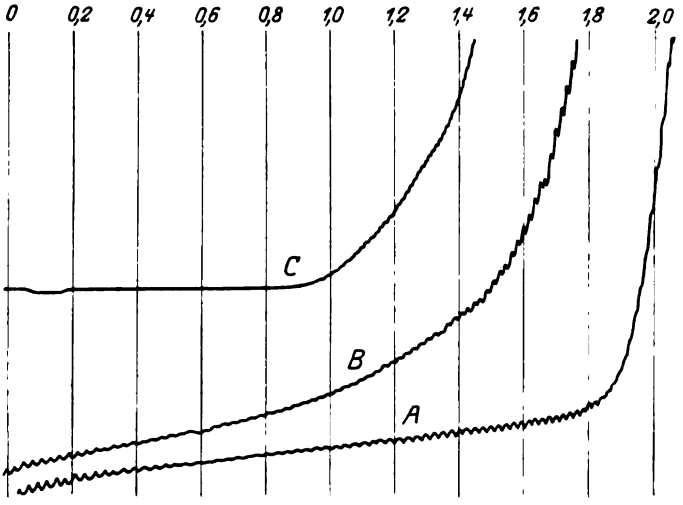


Abb. 4.

Direkte Reproduktion eines Polarogramms von hartem, gutem Trinkwasser. *A* bei maximaler Sensitivität, *C* bei $^1/_{10}$ Sensitivität (Nitratwelle). *B* Moorwasser mit organischer Substanz.

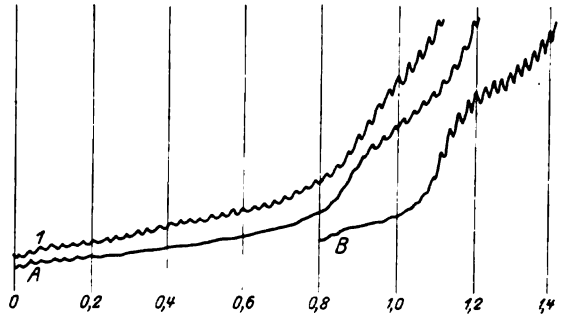


Abb. 5.

10tägige Bohnenkeimlinge, 10 g des Frischgewichts in 100 ccm Wasser zerrieben, Filtrat polarisiert. 1. Stengel, Maximale Sensitivität. *A* Wurzeln, maximale Sensitivität, *B* dieselbe Lösung von den Wurzeln 10 mal verdünnt, maximale Sensitivität.

lich, wo wir die Wellen nicht identifizieren können, wo die Analyse undurchführbar erscheint, aber wo die Verschiebung oder Änderung im Verlauf der Kurve uns Veränderungen in der Zusammensetzung angibt.

Herrn Prof. *Němec* habe ich dafür zu danken, daß er mir die ganze Apparatur zur Verfügung stellte und durch Interesse und Rat bei den Untersuchungen anregte; Herrn Prof. *Heyrovský* spreche ich meinen verbindlichsten Dank für die Einführung in die Methodik und stetige Unterstützung beim Arbeiten aus.

Literatur.

J. Heyrovský, Chem. listy **16**, 256, 1922. — *Derselbe*, Phil. Mag. **45**, 303, 1923. — *Derselbe*, Trans. Farad. Soc. **19**, 692, 1924. — *M. Shikata*, ebendaselbst **19**, 721, 1924; **21**, 42, 53, 1925. — *J. Heyrovský*, C. r. **179**, 1044, 1267, 1924; Chem. listy **19**, 168, 1925. — *P. Herasymenko*, ebendaselbst **19**, 172, 1925. — *J. Heyrovský*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bays **46**, 488, 1925. — *J. Heyrovský* and *M. Shikata*, ebendaselbst **46**, 496, 1925. — *J. Heyrovský*, ebendaselbst **46**, 499, 1925. — *P. Herasymenko*, ebendaselbst **46**, 503, 1925. — *V. Bayerle*, ebendaselbst **46**, 514, 1925. — *J. Březina*, ebendaselbst **46**, 520, 1925. — *N. V. Emelianova*, ebendaselbst **46**, 528, 1925. — *E. B. Sanigar*, ebendaselbst **46**, 549, 1925. — *J. Smrž*, ebendaselbst **46**, 580, 1925. — *V. Podroužek*, ebendaselbst **46**, 591, 1925. — *B. A. Gosman*, ebendaselbst **46**, 600, 1925. — *V. Dolejšek* and *J. Heyrovský*, Nature **116**, 782, 1925. — *J. Heyrovský*, ebendaselbst **117**, 16, 1926. — *V. Dolejšek* and *J. Heyrovský*, Chem. listy **20**, 4, 1926. — *J. Heyrovský*, ebendaselbst **20**, 122, 1926.

Zur Kenntnis des Kohlehydratstoffwechsels.

I. Mitteilung:

Über die Bedeutung des Phosphats für den Umsatz der Kohlehydrate.

Von

I. Abelin.

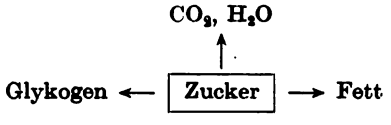
(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der *Ella Sachs-Plotz Foundation*, New York.)

(Eingegangen am 9. Juni 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Das chemische Verhalten der Kohlehydrate im tierischen Organismus läßt sich in groben Umrissen wie folgt zusammenfassen: Ein Teil des Kohlehydrats wird oxydiert, ein Teil wird als Glykogen abgelagert und ein Teil wird in Fett umgewandelt. Wenn wir von allen Zwischenstufen absehen und nur die Ausgangs- und die Endprodukte berücksichtigen, gelangen wir zu folgendem Schema:



Es liegt mehrfacher Grund vor zur Annahme, daß es sich hier, wie auch vielfach sonst, um eine Reihe von gekoppelten Reaktionen handelt. Man findet tatsächlich, daß eine Glykogenablagerung fast immer von einer Oxydation eines Teiles des Kohlehydrats begleitet ist[1]). Dieser Zusammenhang zwischen Glykogenbildung und Zuckeroxydation ist noch nicht ganz geklärt. Die Elementaranalyse ergibt, daß der Zucker (Hexose) und das Glykogen eine zum Teil verschiedene Zusammensetzung haben.

	C Proz.	H Proz.	O Proz.
d-Glykose	40,00	6,67	53,33
Glykogen	44,44	7,77	47,79

[1]) Eine gewisse Sonderstellung nehmen einige von *J. E. Johansson* untersuchten Fälle ein. *Johansson* (Scand. Arch. f. Phys. **16**, 263, 1904; **21**, 1, 1909) fand, daß nach einer Hungerperiode oder bei einer sonstigen Glykogenverarmung der Leber eine Glykogenneubildung auch ohne sehr erhebliche Steigerung der CO_2-Produktion stattfinden kann.

Mag nun der Vorgang der Glykogenbildung über die Stufe der Diamylose *(Karrer)* oder über andere Zwischenprodukte verlaufen, jedenfalls kommt es dabei, wie obige Zahlen angeben, zu einer Anreicherung von Kohlenstoff, zu einer Verarmung an Sauerstoff und zu einer Hebung des chemischen Potentials. Die zur Glykogenbildung nötige chemische Energie wird nach *A. Gigon*[1]) durch die Verbrennung eines Teiles des Kohlehydrats bereitgestellt. Eine Analogie dazu bildet der von *Meyerhof* und *Hill* aufgeklärte Vorgang der Restitution des Muskelglykogens aus der Milchsäure, wo ebenfalls ein Teil der Milchsäure verbrennt und die für die Glykogensynthese nötige Energie liefert. Nach den Berechnungen von *A. Gigon*[1]) müssen ungefähr 10 Proz. vom aufgenommenen Zucker verbrennen, um die Glykogenbildung (nach *Karrer* die Diamylosebildung) zu ermöglichen.

Auch die zweite Art der Verarbeitung des Kohlehydrats, die Umwandlung desselben in Fett, ist mit einer Zerlegung eines Teiles des Zuckers gekoppelt. Wir erkennen diese begleitende Spaltung des Zuckers an dem Freiwerden der Kohlensäure und an dem Steigen des Respirationsquotienten. Nach den Berechnungen von *A. Magnus-Levy*[2]) entstehen aus 100 g Traubenzucker etwa 35 g Fett, daneben werden aber nicht weniger als 47,1 g Kohlensäure und 17,1 g Wasser gebildet. Ebenso wie bei der Gärung wird auch hier die Kohlensäure ohne gleichzeitige Sauerstoffaufnahme (durch Decarboxylierung?) gebildet.

Diese bekannten Wege des Kohlehydratumsatzes, die Glykogen- und die Fettbildung, sind also von einem Freiwerden recht beträchtlicher CO_2-Mengen begleitet. Man darf sich wohl fragen, ob mit diesen beiden Arten der Kohlehydratumwandlung die Zahl der möglichen Formen der Zerlegung des Kohlehydrats erschöpft ist. Bei der großen und vielseitigen Reaktionsfähigkeit des Zuckermoleküls ist dieses kaum zu erwarten.

Wir wissen, besonders dank den neueren Untersuchungen von *C. Neuberg*, daß z. B. die Hefe aus dem gleichen Zuckermolekül je nach den Versuchsbedingungen neben der Kohlensäure recht mannigfache Produkte liefern kann. Auch im tierischen Organismus kann, wie nachfolgende Versuche zeigen, die Kohlehydratzerlegung verschiedene Wege einschlagen. Verfüttert man Ratten Traubenzucker, Rohrzucker oder Reis, und gibt man ihnen gleichzeitig oder nach einiger Zeit Dinatriumphosphat ein, so findet man folgende wesentliche Abweichungen vom normalen Verlauf des Kohlehydratumsatzes[3]). Nach Aufnahme von Kohlehydrat und Phosphat ist die Kohlensäureproduktion bedeutend geringer als nach Verfütterung der gleich großen Menge von Kohlehydrat allein. In Zusammenhang damit kommt es nach Aufnahme von Kohlehydrat und Phosphat nicht zu einem sehr hohen Anstieg des Respirationsquotienten. Der Respirationsquotient bleibt vielmehr innerhalb der Grenzen von 0,75 bis 0,85, während er bei Kohle-

[1]) *A. Gigon*, Helv. chim. acta 8, 36.
[2]) *A. Magnus-Levy*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., 8, 462.
[3]) Vgl. die kurze Mitteilung in der Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 36.

hydrat allein gewöhnlich den Wert von 0,95 bis 1,05 erreicht. In Abb. 1 ist das Verhalten des Respirationsquotienten nach Verfütterung von Kohlehydrat und von Kohlehydrat und Phosphat graphisch dargestellt.

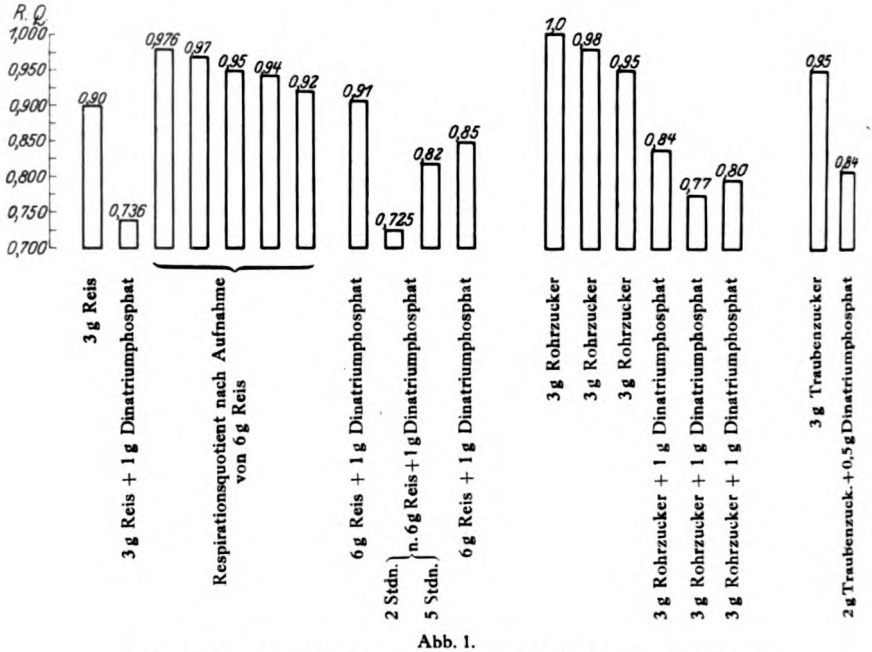


Abb. 1.
Verhalten des respiratorischen Quotienten nach Aufnahme von Kohlehydrat und von Kohlehydrat + Phosphat. (Vgl. Tabellen I, II, III)

Diese Abweichungen vom normalen Verlauf der Kohlehydratzerlegung könnten durch verschiedene Faktoren verursacht sein. Es könnten z. B. rein mechanische Momente mitwirken. Es wäre möglich, daß durch die Eingabe des Phosphats die Resorption des Zuckers verzögert wird. Die Folge davon wäre eine langsam verlaufende Verbrennung des Kohlehydrats, welche den Respirationsquotienten und die CO_2-Ausscheidung nicht so hoch ansteigen ließe. Ich habe mich aber davon überzeugt, daß die Annahme einer Hemmung der Zuckerresorption das Phänomen nicht erklären kann. Tötet man die Ratten etwa 8 oder 10 Stunden nach der Zucker-Phosphateingabe, so findet man häufig den Magen fast leer. Daß die Abweichungen im Respirationsquotienten und in der Größe der CO_2-Ausscheidung nicht auf eine gestörte Zuckerresorption zurückzuführen sind, geht aus folgenden Versuchen hervor. Der Hauptanstieg des Respirationsquotienten und der CO_2-Ausscheidung fällt gewöhnlich in die dritte bis fünfte Stunde nach der Zuckeraufnahme. Der Respirationsquotient steigt hier gewöhnlich

auf 0,85 bis 0,95 an. Gibt man zu dieser Zeit, wo also der allergrößte Teil des Zuckers bereits resorbiert ist, Dinatriumphosphat ein, und bestimmt man darauf wieder den Gaswechsel, so findet man, daß der Respirationsquotient rasch abfällt und die CO_2-Produktion beträchtlich abnimmt. Folgende Darstellung, die den Versuchen 1330 bis 1339, Tabelle IV, entspricht, illustriert die gemachten Beobachtungen (Abb. 2).

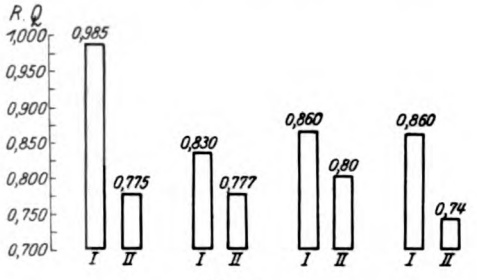


Abb. 2.

I. Respirationsquotient in den ersten $2^1/_2$ bis 3 Stunden nach peroraler Zufuhr von 2 g Rohrzucker.
II. 3 Stunden nach der Zuckeraufnahme erhalten die Tiere 0,75 g Dinatriumphosphat per os. Absinken des Respirationsquotienten in den nachfolgenden Stunden, während normalerweise der Respirationsquotient in diesem Zeitabschnitt noch weiter ansteigt.

Dieser Befund spricht also eher dafür, daß durch das Phosphat die chemische Verarbeitung des Kohlehydrats verändert wird, und zum gleichen Schluß kommt man auch beim Vergleich des Glykogenstoffwechsels nach Einnahme von Kohlehydrat allein und von Kohlehydrat + Phosphat. Während normalerweise, wie bekannt, ein großer Teil

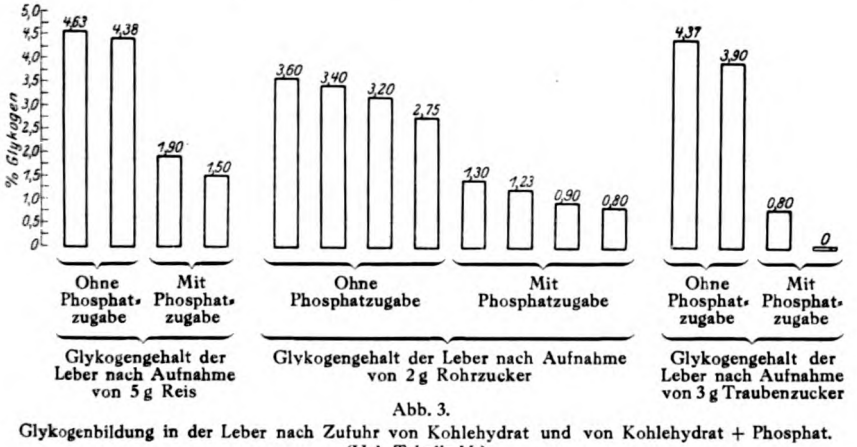


Abb. 3.

Glykogenbildung in der Leber nach Zufuhr von Kohlehydrat und von Kohlehydrat + Phosphat. (Vgl. Tabelle V.)

des Kohlehydrats in der Leber als Glykogen abgelagert wird, findet man nach Eingabe von Kohlehydrat + Phosphat bedeutend geringere Leberglykogenmengen. Aus nachstehender Zusammenstellung und aus Tabelle V erkennt man, daß überall, wo neben dem Kohlehydrat Phosphat eingegeben wurde, die Glykogenneubildung bedeutend geringer ist. Die Hemmung der Glykogenbildung ist beim Traubenzucker und beim Dioxyaceton besonders stark ausgesprochen. Beim Rohrzucker wird durch das Phosphat die Glykogenbildung ungefähr auf ein Drittel und beim Reis ungefähr auf die Hälfte herabgesetzt.

Eine Sonderstellung nimmt die Lävulose ein. Die Tatsache, daß sich die Lävulose im Kohlehydratstoffwechsel anders verhält als die übrigen Hexosen, ist seit den Untersuchungen von *O. Minkowski*[1]) genügend bekannt. Sie wurde von verschiedenen Autoren bestätigt und erweitert. Auch im menschlichen Diabetes ist die Toleranz für Lävulose oftmals höher als für andere Kohlehydrate, und diese interessante Eigentümlichkeit der Lävulose kommt auch im Verhalten gegenüber dem Phosphat deutlich zum Ausdruck. Es hat sich gezeigt, daß die Glykogenbildung in der Leber nach Lävuloseeingabe durch die gleichzeitige oder nachträgliche Zufuhr von Phosphat nicht beeinflußt wird. Sowohl nach Zufuhr von Lävulose allein, als auch nach Eingabe von Lävulose + Phosphat findet man in der Leber eine sehr reiche Anhäufung von Glykogen. Auch dieser Befund spricht gegen eine Resorptionshemmung durch das Phosphat.

Der Einfluß des Phosphats auf den Respirationsquotienten nach Lävuloseeingabe konnte bei diesen Versuchen deshalb nicht zum Vorschein kommen, weil die Lävulose im Gegensatz zu vielen anderen Kohlehydraten bei der Ratte den Respirationsquotienten des Nüchternumsatzes fast unbeeinflußt läßt (vgl. *Abelin* und *Miyazaki*, diese Zeitschr. **149**, 109, 1924). Dagegen findet man, daß die Kohlensäureproduktion und der Sauerstoffverbrauch nach Lävulose + Phosphat geringer ist als nach Lävulose allein. Allerdings ist die Herabsetzung der CO_2 und des O_2 hier nicht so bedeutend wie bei manchen anderen Kohlehydraten.

Eine nähere Analyse der Phosphatwirkung muß zuerst davon ausgehen, daß Dinatriumphosphat die chemische Verarbeitung des Kohlehydrats sowohl 1. dank der Anwesenheit des Phosphorsäureanions als auch 2. dank seiner alkalischen Reaktion beeinflussen könnte. Bei den engen Beziehungen der Phosphate zu dem Kohlehydratumsatz (*Iwanoff*, *Harden* und *Young*, *Neuberg*, *Embden*, *Meyerhof*, *Euler* u. a.) könnte man in erster Linie an eine chemische Reaktion zwischen dem Phosphat und dem Kohlehydrat und an die Bildung eines Kohlehydrat-

[1]) *O. Minkowski*, Unters. über den Diabetes mell., S. 80ff. Leipzig 1893.

Phosphorsäureesters denken. Ich habe diese Ansicht eine Zeitlang geteilt und wurde sogar in dieser Auffassung durch den Befund unterstützt, daß ein Kohlehydrat-Phosphorsäureester, welcher bei der Zuckergärung gewonnen wird (hexosediphosphorsaures Calcium), beim Tiere tatsächlich keine Erhöhung des Respirationsquotienten hervorruft und somit vom gewöhnlichen Kohlehydrat abweicht und an das Verhalten der hier benutzten Kombination Kohlehydrat + Phosphat erinnert. Ich konnte aber in weiteren, gemeinsam mit *B. Kobori* durchgeführten Versuchen feststellen, daß es außer dem Phosphat eine Reihe anderer Salze gibt, welche den Kohlehydratstoffwechsel in analoger Weise beeinflussen, d. h. den Respirationsquotienten sowie die CO_2 herabsetzen und die Glykogenbildung hemmen. Die Möglichkeit einer teilweisen Veresterung des Kohlehydrats durch das Phosphat ist zwar nicht ganz auszuschließen, doch kann darin kaum eine Erklärung für das veränderte biochemische Verhalten der Kohlehydrate bei Phosphatzugabe gesucht werden.

Werden die beobachteten Phänomene durch die alkalische Reaktion des Dinatriumphosphats verursacht? *C. Neuberg*[1]) hat nachgewiesen, daß unter dem Einfluß von alkalisch reagierenden Salzen wie Bicarbonat, Phosphat und anderen die Zuckerzerlegung durch die Hefe verändert wird, und neben Kohlensäure und Alkohol Essigsäure und Glycerin gebildet werden. Es wäre also denkbar, daß beim Zusammentreffen des alkalisch reagierenden Dinatriumphosphats mit dem Zucker neue Produkte entstünden, welche von den Zellen anders als das native Kohlehydrat verarbeitet würden. Diese Hypothese ließ sich aber experimentell ebenfalls nicht stützen, denn ich konnte feststellen, daß das sauer reagierende Mononatriumphosphat in ähnlichem Sinne auf den Kohlehydratumsatz wirkte und den Respirationsquotienten und die Kohlensäureproduktion herabdrückte.

Somit liefert weder die Annahme der Entstehung einer Kohlehydratphosphorsäureverbindung, noch eine etwaige Beeinflussung durch die H^- oder OH^+ der Phosphate eine befriedigende Erklärung für deren so auffallende Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel. Zur weiteren Klärung dieser sehr verwickelten Fragen habe ich eine Reihe von Versuchen über den Einfluß anderer Salze auf den Kohlehydratumsatz im Organismus angestellt. Die Versuche sollen hier kurz erwähnt werden.

Gemeinsam mit *W. Bachmann* durchgeführte Versuche haben ergeben, daß nicht nur die perorale Eingabe von Di- oder Mononatriumphosphat,

---

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **96**, 192, 1919; **100**, 304, 1919; **105**, 307, 1920; Ergebn. d. Phys. **21**, 400, 1923.

sondern auch die Zufuhr von Natriumbicarbonat, oder von Natriumsulfit, oder von Calciumchlorid, oder von Karlsbader Salz usw. die Glykogenbildung aus dem gleichzeitig aufgenommenen Kohlehydrat hemmt. Ich habe ferner gemeinsam mit *Goldener*[1]) die Beobachtung gemacht, daß beim Kaninchen nach peroraler Zufuhr von Lävulose und Dinatriumphosphat oder von Glucose und Dinatriumphosphat der Anstieg des Blutzuckers rascher erfolgt und höhere Werte aufweist als bei Eingabe der gleich großen Menge dieser Zuckerarten für sich allein. In Fortsetzung dieser Befunde konnten wir feststellen[1]), daß auch die Insulinhypoglykämie durch die Phosphateingabe beeinflußt wird. Spritzt man einem Kaninchen 2 bis 3 Insulineinheiten *(Eli Lilly)*, und gibt man eine halbe Stunde nach der Injektion 1 g Dinatriumphosphat per os ein, so kommt es entweder zu keiner, oder zu einer bedeutend geringeren Hypoglykämie als bei Eingabe von Insulin allein. Bei größeren Insulindosen vermag zwar das Dinatriumphosphat die Hypoglykämie nicht zu unterdrücken, wohl aber abzuschwächen. Bei Eingabe von Mononatriumphosphat war die Insulinhypoglykämie manchmal verstärkt. Nach peroraler Zufuhr von Dinatriumphosphat allein haben wir beim normalen Tiere keine Änderung des Blutzuckers gesehen[2]). *H. Elias, C. Popesen-Inotesti* und *C. St. Radoslav*[3]) haben dagegen beim Tier durch intravenöse Injektion von Phosphatlösungen bald eine Hyperglykämie, bald eine Hypoglykämie erzielt. Beim gesunden Menschen bleibt aber nach den Angaben dieser Autoren der Blutzucker nach Einspritzung von hypertonischen Phosphatlösungen unverändert. Beim Diabetiker sowie in Fällen von alimentärer Hyperglykämie kommt es dagegen nach intravenöser Injektion von Mono- und Dinatriumphosphat zu einer Herabsetzung des Blutzuckers für einige Zeit [*H. Elias* und *A. Löw*[4])]. Diese Angaben von *Elias* und *Löw* wurden neuerdings durch *K. Friedländer* und *H. Rosenthal*[5]) bestätigt. Beim pankreasdiabetischen Hunde und bei der Adrenalinhyperglykämie kommt es nach Phosphatinjektion ebenfalls zu einer Herabsetzung der Blutzuckerkonzentration [*Elias* und Mitarbeiter[6])]. Bei der Durchströmung der Froschleber mit Zuckerlösungen haben *Elias* und *Löw*[7]) festgestellt, daß durch den Zusatz von Phosphat die Glykogenanhäufung in der Leber nicht unterstützt wird. Der Einfluß der Phosphate auf den Blutzucker des normalen Tieres wurde neuerdings auch von *T. Kurokawa*[8]) untersucht, der ebenso wie wir keine Veränderung der Blutzuckerkonzentration finden konnte. Die bisherigen Erfahrungen sprechen dafür, daß die Phosphate (und wahrscheinlich auch mehrere andere Elektrolyte) besonders dann wirksam sind, wenn gleichzeitig eine erhöhte Zuckertransformation stattfindet (nach Kohlehydrataufnahme, bei Diabetes, nach Pankreasentfernung, nach Insulininjektion).

---

[1]) *J. Abelin* und *E. Goldener*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 36 und 37.

[2]) Ebendaselbst, Nr. 37.

[3]) *H. Elias, C. Popesen* und *C. St. Radoslav*, diese Zeitschr. 188, 284, 1923.

[4]) *H. Elias* und *A. Löw*, Wien. Arch. f. inn. Med. 4, 29, 1922.

[5]) *K. Friedländer* und *H. Rosenthal*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 112, 65, 1925.

[6]) *H. Elias* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 188, 294, 299, 1923.

[7]) *H. Elias* und *Löw*, diese Zeitschr. 188, 279, 1923.

[8]) *T. Kurokawa*, The Tohoku Journ. of exper. Med. 5, 445, 1925.

Da auch aus Eiweiß Kohlehydrat entsteht, so habe ich noch das Verhalten des Gaswechsels nach Eingabe von Eiweiß allein und von Eiweiß + Phosphat untersucht. Es wurde den Tieren einmal Fleisch, das andere Mal die gleiche Menge Fleisch + Phosphat verfüttert. Als Beispiel mögen folgende Versuche dienen:

	R.-Q.	Pro kg und Stunde		
		CO_2 g	O_2 g	Kal.
10 g Rindfleisch, roh	0,800	1,8	1,6	5,45
10 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	0,774	1,67	1,56	5,30
7 g Rindfleisch, roh	0,803	2,00	1,78	6,13
7,5 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	0,747	1,52	1,48	5,02
6 g Rindfleisch, roh	0,77	1,77	1,68	5,71
6 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	0,730	1,55	1,54	5,25

Man findet auch hier die beiden charakteristischen Merkmale der Phosphatwirkung: Der Respirationsquotient steigt nach Fleisch + Phosphat nicht so hoch an wie nach Aufnahme von Fleisch allein, und ferner ist bei Fleisch + Phosphat die Erhöhung der Kohlensäureproduktion nicht so erheblich wie bei Eingabe der gleichen Menge Fleisch für sich. Ausführlich wird über diese Versuche gemeinsam mit *B. Kobori* berichtet werden.

Eine befriedigende Erklärung für die eigentümliche Phosphatwirkung auf den Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel kann vorläufig nicht gegeben werden. *Eines geht aber aus den mitgeteilten Versuchen deutlich hervor, nämlich, daß der Kohlehydratstoffwechsel nicht nur vom Kohlehydrat oder von den Kohlehydratbildnern, wie Eiweiß und eventuell Fett, sondern auch von den Elektrolyten wesentlich abhängig ist.* Und bei jeder Erforschung des Kohlehydratstoffwechsels muß nicht nur der Menge der zugeführten Kohlehydrate und der Kohlehydratbildner, sondern auch der Menge und der Art der aufgenommenen Elektrolyte weitgehend Rechnung getragen werden.

Experimenteller Teil.

Die Bestimmung des Gaswechsels erfolgte nach der in den früheren Arbeiten angebenen Methode[1]). Zu den Versuchen wurden weiße Ratten benutzt, welche in einer Reihe von Vorversuchen an die Versuchsbedingungen gewöhnt wurden. In den Protokollen bedeutet „nüchtern" 16 bis 18 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme. Auch zu den Versuchen mit Kohle-

[1]) Vgl. *J. Abelin*, diese Zeitschr. **101**, **129**, **137**, **149**.

hydrat und mit Kohlehydrat + Phosphat wurden nur „nüchterne" Tiere benutzt. Die Eingabe des Zuckers erfolgte per os mittels Magensonde. Der Reis wurde von den Tieren gerne gefressen. Eine abgewogene Menge Reis wurde in Wasser weich gekocht und den Tieren vorgelegt. Allermeistens fraßen die Tiere die gesamte dargereichte Reismenge innerhalb ½ bis 1 Stunde. Ratten, welche sich nicht an die Reisnahrung gewöhnen ließen, wurden von den Versuchen ausgeschaltet. Das Phosphat wurde in wenig Wasser aufgelöst und mittels einer Sonde eingegeben. Zwischen der Zucker- und der Phosphateingabe verging gewöhnlich ½ bis 1 Stunde. Die in den Tabellen angegebenen Phosphatmengen beziehen sich auf das wasserfreie Dinatriumphosphat.

A. Versuche mit Rohrzucker und Phosphat.

Man erkennt aus Tabelle I, daß bei der Eingabe von Rohrzucker und Phosphat der respiratorische Quotient jedesmal niedriger ist als in den Versuchen, wo nur Rohrzucker gegeben wurde. Der Unterschied im Respirationsquotienten beträgt gewöhnlich 0,15 bis 0,20, er ist also recht erheblich. In manchen Versuchen (vgl. Versuche 1290, 1291, 1294, 1295, 1300, 1301, 1303) unterscheidet sich sogar der Respirationsquotient nach Eingabe von Rohrzucker und Phosphat nur unwesentlich vom Respirationsquotienten des Nüchternzustandes. Ebenso wie der Respirationsquotient ist auch die Kohlensäureproduktion nach Einnahme von Kohlehydrat und Phosphat geringer, als nach Zufuhr der gleichen Rohrzuckermenge für sich. In Versuch 1289 wurde nach peroraler Zufuhr von 3 g Rohrzucker bei einem Respirationsquotienten von 0,978 3,20 g CO_2 pro Kilogramm und Stunde ausgeschieden. In Versuch 1291 hatte das gleiche Tier nach Aufnahme von 3 g Rohrzucker + 1 g Dinatriumphosphat eine Kohlensäureausscheidung von 2,19 g, und der Respirationsquotient war bloß 0,750. Auch nach Eingabe von Mononatriumphosphat und Rohrzucker (Versuch 1290) war die CO_2-Ausscheidung 2,34 g pro Kilogramm und Stunde. Ein analoges Resultat ergibt auch ein Vergleich der Versuche 1293 und 1294 und 1295, oder 1298 und 1299, 1300 und 1301, oder 1302 und 1303.

Was die Gesamtkalorienproduktion anbetrifft, so ist dieselbe nach Einnahme von Kohlehydrat und Phosphat manchmal geringer als nach Kohlehydrat allein (vgl. Versuche 1286 und 1287, 1288; 1289 und 1290, 1291; 1298 und 1299, 1300); in anderen Fällen aber bleibt die Kalorienproduktion fast unverändert (vgl. Versuche 1293 und 1294, 1302 und 1303). Bei der Beurteilung der Gesamtkalorienproduktion müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden: erstens, der Grad der Erhöhung des Respirationsquotienten nach Aufnahme von Kohlehydrat allein und zweitens, die Höhe des Respirationsquotienten nach Zufuhr von Kohlehydrat und Phosphat. Ist z. B. nach Kohlehydrat-Phosphatzufuhr der Respirationsquotient ziemlich tief (0,75 bis 0,80), so läßt er sich kaum mit dem Respirationsquotienten nach Kohlehydrataufnahme vergleichen, denn der Sauerstoffverbrauch ist in beiden Fällen ganz verschieden. In solchen Fällen sagt der Vergleich der CO_2-Ausscheidung mehr aus.

B. Versuche mit Reis und Phosphat.

Verfüttert man etwa 3 g Reis und gibt man dazu 1 g Dinatriumphosphat, so ist die Herabsetzung des Respirationsquotienten beträchtlich (vgl. Versuche 1304 und 1305). Aber auch bei 6 g Reis allein und bei 6 g Reis und

Tabelle 1. Versuche mit Rohrzucker und Phosphat.

Nr.	Datum 1924	Art der Fütterung und Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Aufnahme g	R.-Q.	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde	Gewicht des Tieres g	Dauer des Versuchs Stdn.	Temperatur des Versuchskastens
		Ratte 1.										
1284	31. VII.	Nüchtern	2,10	2,06	2,03	0,734	2,17	2,14	7,20	135,6	7	28–29°
1285	4. VIII.	„	0,77	1,87	1,72	0,790	2,24	2,06	7,01	139,0	6	28°
1286	5. VIII.	1 Std. nach Eing. v. 3 g Rohrz. per os	0,67	1,65	1,20	*1,00*	2,41	2,11	7,48	141,9	4	28
1287	6. VIII.	½ „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	1,36	1,59	1,37	*0,843*	2,27	1,95	6,71	140,4	5	28
1288	8. VIII.	Ebenso	0,93	1,44	1,20	*0,870*	2,02	1,68	5,81	142,7	5	28–29°
		Ratte 2.										
1289	25. X.	¾ Std. nach Aufn. v. 3 g Rohrz. per os	0,63	2,06	1,53	*0,978*	3,20	2,37	8,38	161	4	24–25°
1290	27. X.	½ „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Mononatriumphosphat per os . .	0,54	2,02	1,86	*0,789*	2,34	2,16	7,34	172,6	5	22°
1291	29. X.	½ Std. nach Aufn. v. 3 g Rohrz. + 1 g Dinatriumphosphat per os	0,85	1,94	1,88	*0,750*	2,19	2,12	7,16	177,8	5	25
		Ratte 3.										
1292	23. X.	Nüchtern	0,98	2,68	2,68	0,726	2,43	2,43	8,15	184	6	22
1293	25. X.	½ Std. nach Aufn. v. 3 g Rohrz. per os	0,56	2,74	2,23	*0,901*	3,09	2,51	8,71	177,7	5	22
1294	27. X.	½ „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	1,36	2,38	2,16	*0,800*	2,65	2,41	8,21	179,6	5	23
1295	30. X.	½ Std. nach Aufn. v. 2 g Rohrz. + 0,5 g Dinatriumphosphat	0,87	1,63	1,47	*0,806*	2,05	1,85	6,33	216,7	3,5	27
		Ratte 4.										
1296	29. VII.	Nüchtern	1,23	1,80	1,78	0,734	1,85	1,83	6,16	177	5,5	27–28°
1297	31. VII.	„	0,95	2,24	2,22	0,733	1,84	1,82	6,13	174	7	28–29
1298	2. VIII.	½ Std. nach Aufn. v. 3 g Rohrz. per os	1,14	2,77	2,07	*0,975*	2,58	1,93	6,79	195,2	5,5	28°
1299	6. VIII.	½ „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Dinatriumphosphat per os	0,71	1,83	1,53	*0,869*	2,03	1,70	5,88	179,9	5	28
1300	11. VIII.	Ebenso	0,85	1,98	1,85	*0,770*	2,00	1,87	6,34	180	5,5	27
1301	15. VIII.	½ Std. nach Aufn. v. 2 g Rohrz. + 1 g Dinatriumphosphat	0,78	1,47	1,38	*0,774*	2,03	1,90	6,45	181,3	4	28
		Ratte 5.										
1302	23. X.	½ Std. nach Aufn. v. 3 g Rohrz. per os	0,53	2,30	1,76	*0,950*	2,84	2,17	7,62	162,2	5	24
1303	35. X.	½ „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Mononatriumphosphat	0,62	1,99	1,81	*0,798*	2,42	2,20	7,53	164	5	23–24°

1 g Dinatriumphosphat ist der Unterschied im Respirationsquotienten unverkennbar (vgl. Versuche 1315 und 1316). In den Versuchen 1320 und 1321 wurde nach Zufuhr von 6,5 g Reis der Gaswechsel in 3½ Stundenperioden verfolgt. In den ersten 3½ Stunden nach der Reisaufnahme ist der Respirationsquotient 1,00, in den nachfolgenden 3½ Stunden 0,90. Nach Eingabe von 6 g Reis und 1 g Dinatriumphosphat (Versuche 1313 und 1314) bleibt der Respirationsquotient in den ersten 2 Stunden auf dem Nüchternwert (0,726), in den nachfolgenden 3 Stunden steigt er nur auf 0,818. In den Versuchen 1322 und 1323 finden wir nach 7 g Reis und 0,5 g Dinatriumphosphat in den ersten 3 Stunden einen Respirationsquotienten von 0,883, in den nachfolgenden 3 Stunden 0,886.

Demgegenüber hat in Versuch 1312 die Zugabe von 1 g Dinatriumphosphat zu 6 g Reis fast keinen Einfluß auf den Respirationsquotienten und auf die CO_2-Ausscheidung gehabt: beide Werte sind ziemlich hoch.

C. Versuche mit Traubenzucker und Phosphat und mit Lävulose + Phosphat.

Diese Versuche ergeben das gleiche Bild wie die Rohrzuckerversuche: Traubenzucker und Dinatriumphosphat rufen keine so hohen Steigerungen des Respirationsquotienten und der CO_2-Ausscheidung hervor, wie die gleichen Mengen Traubenzucker für sich allein genommen (vgl. Versuche 1325, 1326 und 1324, 1327, 1328 und 1329).

Bei den Versuchen mit Lävulose fällt zuerst auf, daß dieses Kohlehydrat den Respirationsquotienten fast unbeeinflußt läßt. Dieses gilt aber nur für die Ratte. Beim Menschen, sowie auch beim Hunde und bei anderen Tieren, ruft dagegen die Lävulosezufuhr einen sehr rapiden und einen sehr hohen Anstieg des Respirationsquotienten hervor. Der Respirationsquotient nach Eingabe von Lävulose allein und von Lävulose + Phosphat ist fast der gleiche. Die Kohlensäureausscheidung und die Kalorienproduktion erfährt aber durch die Phosphatzulage eine unverkennbare Beeinflussung. Der besseren Übersicht halber wurde der Gaswechsel in zweistündigen Abständen verfolgt. Vergleicht man die Mittelwerte der CO_2-Ausscheidung, des O_2-Verbrauchs und der Kalorienproduktion bei Verfütterung einmal von Lävulose allein, das andere Mal bei Eingabe von Lävulose + Phosphat, so erkennt man unschwer, daß in jedem Versuchsabschnitt die Zahlen bei Lävulose + Phosphat geringer sind als bei Lävulose. In dieser Beziehung wirkt also das Phosphat auf den Stoffwechsel der Lävulose in ähnlichem Sinne wie auf den Umsatz der anderen Kohlehydrate.

D. Versuche mit Zufuhr von Rohrzucker und nachträglicher Eingabe von Dinatriumphosphat.

In den früheren Versuchen wurde das Phosphat ½ bis 1 Stunde nach der Kohlehydratzufuhr eingegeben. Zur näheren Erforschung der Frage, ob eventuell durch das Phosphat die Zuckerresorption gestört wird, wurde bei diesen Versuchen so verfahren, daß zuerst der Gaswechsel nach Zufuhr von Kohlehydrat allein untersucht wurde. 3 bis 4 Stunden nach der Rohrzuckerverfütterung, also auf der Höhe der Kohlehydratverarbeitung, erhielten die Tiere das Phosphat und kamen ½ Stunde darauf wieder in den Versuchskasten. Wie die Versuche 1330 und 1331 sowie die allgemeinen

Tabelle II. Versuche mit Reisfütterung und Phosphateingabe.

Nr.	Datum 1924	Art der Fütterung und Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Aufnahme g	R.-Q.	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde	Gewicht des Tieres g	Dauer des Versuchs Stdn.	Temperatur des Versuchskastens
		Ratte 1.										
1304	1. XI.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Reis . .	0,55	2,75	2,24	*0,900*	3,09	2,50	8,69	177,8	5	22°
1305	3. XI.	1 „ „ „ „ 3 g „ + 1 g Dinatriumphosphat	0,41	1,61	1,59	*0,736*	2,04	2,01	6,78	197,6	4	21
1306	5. XI.	Nüchtern	0,98	2,65	2,65	0,726	2,43	2,43	8,15	184,0	6	22
		Ratte 2.										
1307	14. XI.	3/4 Std. nach Aufn. v. 5 g Reis	1,45	2,45	1,75	*1,02*	2,55	1,82	6,47	213,5	4,5	28
1308	16. XI.	1 „ „ „ „ 3,75 g Reis + 1 g Dinatriumphosphat	0,90	1,61	1,55	*0,755*	2,26	2,17	7,37	178,2	4	28
		Ratte 3.										
1309	17. XI.	1 Std. nach Aufn. von 6 g Reis (roh)	1,18	3,60	2,68	*0,976*	2,00	1,49	5,26	299,26	6	27–28°
1310	19. XI.	1/2 „ „ „ „ 5 g „ „	1,22	3,48	2,66	*0,950*	1,99	1,52	5,33	291,8	6	28°
1311	21. XI.	1 1/2 „ „ „ „ 6 g „ „	1,26	3,56	2,80	*0,924*	1,96	1,58	5,50	296,0	6	27
1312	23. XI.	1/2 „ „ „ „ 6 g „ „ + 1 g Dinatriumphosphat	1,21	3,33	2,64	*0,916*	1,88	1,49	5,20	295,0	6	27–28°
1313	25. XI.	Ebenso	1,20	1,10	1,10	*0,726*	1,83	1,83	6,20	303,0	2	27°
1314	25. XI.	2 1/2 Std. nach Aufn. von 6 g Reis (roh) + 1 g Dinatriumphosphat	0,63	1,69	1,50	*0,818*	1,88	1,67	5,70	300,5	3	27
1315	5. XII.	3/4 Std. nach Aufn. von 6 g Reis (roh)	0,99	3,60	2,69	*0,971*	2,25	1,68	5,93	267,0	6	28
1316	7. XII.	1/2 „ „ „ „ 6 g „ „ + 1 g Dinatriumphosphat	0,94	3,52	2,99	*0,855*	2,11	1,79	6,20	278,0	6	28
1317	9. XII.	1,5 Std. nach Aufn. von 6 g Reis (roh)	0,98	3,71	2,88	*0,940*	2,26	1,76	6,15	273,0	6	28
		Ratte 4.										
1318	28. XI.	1 Std. nach Aufn. von 5 g Reis (roh)	1,08	2,46	1,67	*1,07*	2,56	1,75	6,20	193,5	5	28
1319	30. XI.	1 1/4 Std. „ „ „ 5 g „ „	1,72	2,41	1,72	*1,02*	2,44	1,76	6,22	196,4	5	28
1320	15. XII.	3/4 „ „ „ „ 6,5 g „ (gek.)	0,62	1,37	1,00	*1,00*	2,59	1,89	6,70	151,0	3,5	28
1321	15. XII.	4 1/4 „ „ „ „ 6,5 g „ „	0,79	1,16	0,94	*0,900*	2,21	1,79	6,22	150,0	3,5	28
1322	17. XII.	1/2 „ „ „ „ 7,0 g „ „ + 0,5 g Dinatriumphosphat	0,61	1,24	1,02	*0,883*	2,19	1,80	6,23	189,0	3	28
1323	17. XII.	3 1/2 Std. nach Aufn. v. 7,0 g Reis (gek.) + 0,5 g Dinatriumphosphat	0,82	1,33	1,09	*0,886*	2,36	1,94	6,72	187,5	3	28

Tabelle III. Versuche mit Traubenzucker und Phosphat und mit Lävulose + Phosphat.

Nr.	Datum 1924	Art der Fütterung und Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Aufnahme g	R.-Q.	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde	Gewicht des Tieres g	Dauer des Versuchs Stdn.	Temperatur des Versuchskastens
		Ratte 1.										
1324	22. VIII.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Traubenz.	1,19	2,75	2,10	*0,95*	2,46	1,88	6,61	202,6	5,5	28°
1325	28. VIII.	1/2 „ „ „ „ 2 g „ + 0,5 g Dinatriumphosphat	2,09	2,48	2,15	*0,838*	2,03	1,76	6,06	244,1	5	28
1326	9. IX.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Traubenz. + 1 g Dinatriumphosphat	0,75	1,87	1,67	*0,814*	2,00	1,78	6,09	187,3	5	28
		Ratte 2.										
1327	3. VIII.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Traubenz.	0,80	1,78	1,34	0,970	2,49	1,86	6,50	143,5	5	28
1328	5. VIII.	Ebenso	1,00	2,10	1,44	1,06	2,75	1,89	6,76	152,3	5	28
1329	7. VIII.	Ebenso	1,05	1,82	1,24	1,06	2,50	1,63	5,80	147,0	5	28
		Ratte 3.										
	16. I.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävulose	0,60	0,89	0,88	0,734	2,04	1,99	6,71	218,5	2	27–28
	16. I.	2 1/2 „ „ „ „ 3 g „	0,62	1,00	0,92	0,789	2,30	2,11	7,22	218	2	27–28
	16. I.	4 1/2 „ „ „ „ 3 g „	0,35	0,99	0,90	0,799	2,88	2,07	7,07	217,2	2	27–28
					Mittelwert:		2,42	2,06	7,00			
*)	21. I.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävoluse + 1 g Dinatriumphosphat	0,23	0,81	0,74	0,795	1,84	1,68	5,74	220	2	27–28
*)	21. I.	2 1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävulose + 1 g Dinatriumphosphat	0,29	0,84	0,80	0,763	1,91	1,82	6,17	219,7	2	27–28
*)	21. I.	4 1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävulose + 1 g Dinatriumphosphat	0,48	0,89	0,82	0,788	2,03	1,87	6,36	219,3	2	27–28
					Mittelwert:		1,93	1,76	6,10			
		Ratte 4.										
	12. I.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävulose	0,32	0,88	0,82	0,780	2,10	1,96	6,65	209,7	2	27–28
	12. I.	2 1/2 „ „ „ „ 3 g „	0,50	0,90	0,78	0,838	2,15	1,82	6,40	209,3	2	27–28
					Mittelwert:		2,12	1,89	6,52			
*)	23. I.	1/2 Std. nach Aufn. von 3 g Lävulose + 1 g Dinatriumphosphat	0,45	0,44	0,74	0,726	1,73	1,73	5,82	214	2	27–28
*)	23. I.	3 Stdn. nach Aufn. von 3 g Lävulose + 1 g Dinatriumphosphat	0,22	0,78	0,73	0,776	1,83	1,70	5,81	213,5	2	27–28
*)	23. I.	5 Stdn. nach Aufn. von 3 g Lävulose + 1 g Dinatriumphosphat	0,19	0,81	0,76	0,774	1,90	1,78	6,05	213,3	2	27–28
					Mittelwert:		1,82	1,74	5,88			

*) Die Versuche mit Lävulose und mit Lävulose + Phosphat sind einer früheren Untersuchung entnommen (vgl. diese Zeitschr. 149, 116, 1924).

Tabelle IV. Gaswechsel nach Zufuhr von Kohlehydrat und nachträglicher Eingabe von Dinatriumphosphat.

Nr.	Datum 1924	Art der Fütterung und Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Aufnahme g	R.-Q.	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde	Gewicht des Tieres g	Dauer des Versuchs Stdn.	Temperatur des Versuchskastens
		Ratte 1.										
1330	5. V.	1/2 Std. nach Aufn. v. 2,3 g Rohrz. per os	0,63	1,72	1,50	0,833	2,53	2,21	7,40	302,0	2,25	22–23°
1331	5. V.	3 Stdn. „ „ „ 2,3 g „ „ „	1,02	1,97	1,67	0,857	3,30	2,80	9,61	300,0	2	24–25
1332	12. V.	1/2 Std. „ „ „ 2,0 g „ „ „	0,54	1,94	1,43	0,985	3,33	2,45	8,65	292,0	2	20–21
1333	12. V.	3 Stdn. nach d. Rohrzuckerzuf. erhielt das Tier 0,75 g Dinatriumph. per os	0,83	1,11	1,04	0,775	2,01	1,88	6,38	277,0	2	21–22
		Ratte 2.										
1334	4. V.	1/2 Std. nach Aufn. v. 2 g Rohrz. per os	0,79	1,51	1,32	0,831	4,36	3,81	12,8	154,0	2,25	22°
1335	4. V.	3 Stdn. n. d. Rohrzuckereing. erhielt das Tier 0,75 g Dinatriumphosphat	0,71	1,07	0,99	0,777	3,47	3,25	11,0	154,0	2	21
1336	12. V.	1/2 Std. nach Aufn. v. 2 g Rohrz. per os	0,67	1,36	1,15	0,860	4,24	3,60	12,4	160,5	2	20–21°
1337	12. V.	3 Stdn. nach d. Rohrzuckerzuf. erhielt das Tier 0,75 g Dinatriumphosphat	0,66	1,15	1,04	0,803	3,56	3,22	11,0	161,0	2	21°
1338	18. V.	1 Std. nach Aufn. v. 2 g Rohrz. per os	0,58	1,57	1,33	0,857	3,53	3,00	10,3	178,0	2,5	22
1339	18. V.	4 Stdn. nach d. Rohrzuckerzuf. erhielt das Tier 0,75 g Dinatriumphosphat	0,57	1,02	0,94	0,741	2,91	2,86	9,64	175,0	2	20–21°
		Ratte 3.										
1340	30. IV.	1/2 Std. n. Aufn. v. 2 g Rohrz. *subkutan*	1,11	2,20	2,09	0,765	2,72	2,59	8,78	202,0	4	22–23
1341	30. IV.	Ebenso	1,27	2,52	2,37	0,774	4,05	3,81	12,9	155,5	4	22–23
1342	30. IV.	Ebenso	2,09	1,83	1,73	0,768	2,79	2,63	8,94	164,0	4	22–24

Tabelle V. Glykogengehalt der Leber und der Muskeln bei Einga

Nr.	Datum	Art der Fütterung
	1924	Ra
1	3. XII.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung Fütterung mit 2 Rohrzucker . . . . .
2	3. XII.	6 Stdn. vor der Tötung Fütterung mit 2 g Rohrzucker . . . . .
3	5. XII.	Ebenso . . . . .
4	5. XII.	Ebenso . . . . .
5	10. XII.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung Eingabe von 2 Rohrzucker + 0,5 g Dinatriumphosphat . . . . .
6	10. XII.	6 Stdn. vor der Tötung Eingabe von 2 g Rohrzucker + 0,5 g D natriumphosphat . . . . .
	1925	
7	5. III.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 7,5 Stdn. vor der Tötung Eingabe von 2 Rohrzucker und 5,5 Stdn. vor der Tötung Eingabe von 1 g D natriumphat . . . . .
8	5. III.	7,5 Stdn. vor der Tötung Eingabe von 2 g Rohrzucker und 5,5 Std vor der Tötung Eingabe von 1 g Dinatriumphosphat . . . .
		Ra
9	16. I.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung 5 g Reis . . .
10	4. II.	„ 30 „ „ 6 „ „ „ „ 6 g „ . . .
11	13. I.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung 5 g Reis, 5 Std vor der Tötung 1 g Dinatriumphosphat . . . . .
12	13. I.	Ebenso . . . . .
		Ra
13	31. I.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung 3 g Traubenzuck
14	31. I.	Ebenso . . . . .
15	4. II.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 6 Stdn. vor der Tötung 3 g Traubenzucke 4 Stdn. vor der Tötung 1 g Dinatriumphosphat . . . . .
16	4. II.	Ebenso . . . . .
		Ra
17	11. II.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 8 Stdn. vor der Tötung 3 g Dioxyacet
18	11. II.	Ebenso . . . . .
19	12. II.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 8 Stdn. vor der Tötung 3 g Dioxyaceto 6 Stdn. vor der Tötung 1 g Dinatriumphosphat . . . . .
20	5. III.	Ebenso . . . . .
		Ra
21	25. II.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 7 Stdn. vor der Tötung 2 g Lävulose
22	25. II.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 7 Stdn. vor der Tötung 2 g Lävulo + 0,75 g Dinatriumphosphat . . . . .
23	20. III.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 8 Stdn. vor der Tötung 2 g Lävulo 6 Stdn. vor der Tötung 1 g Dinatriumphosphat . . . . .
24	20. IV.	Vorher 30 Stdn. Hunger. 8 Stdn. vor der Tötung 3 g Lävulo $6^1/_2$ Stdn. vor der Tötung 1 g Dinatriumphosphat . . . . .
25	20. IV.	Ebenso . . . . .

*) Doppelanalyse.

Kohlehydrat allein und von Kohlehydrat und Phosphat.

ber. richt	Leberglykogen		Menge der analysierten Muskelsubstanz	Muskelglykogen		Bemerkungen
g	g	Proz.	g	mg	Proz.	
),7	0,224	3,41	9,5	44,5	0,468	
),5	0,234	2,75	10,0	46,3	0,463	
),7	0,183	3,22	—	—	—	
),5	0,198	3,60	—	—	—	
,0	0,093	1,30	9,8	19,0	0,198	Bei der Tötung findet man im Magen etwa 1 ccm einer schleimigen Flüssigkeit, die stark sauer reagiert.
,0	0,063	0,90	11,3	0	0	Bei der Tötung findet man im Magen etwa 3 ccm einer sauer reagierenden Flüssigkeit.
5,0	0,074	1,23	12,9	48,36	0,38	
5,0	0,04	0,80	10,7	18,88	0,18	
7,4	0,343	4,63	12,1	465	0,39	Der Magen enthält noch Reisbrei.
6,4	0,279	4,38	12,3	372	0,30	
6,6	0,0989	1,50	14,3	58,12	0,41	Der Magen enthält noch Reisbrei. Reaktion sauer.
7,8	0,148	1,90	15,0	55,8	0,37	
7,2	0,315	4,37	—	—	—	
6,5	0,255	3,90	—	—	—	
4,7	0,0	0,0	12,7	17,6	0,14	
4,4	0,035	0,80	12,2	34,1	0,28	
5,8	0,150	2,40	11,6	35,0	0,30	
6,8	0,235	3,20	10,7	53,8	0,46	
6,2	0,0087	0,14	10,4	55	0,49	
4,4	0,0	0,00	9,7	16,4	0,17	
5,4	0,210	3,60	11,7	31,1	0,24	
4,9	0,139	2,38	9,8	31,1	0,29	
5,9	0,232	3,94	10,5	0,0	0,0	
7,6	0,252	3,23*)	—	—	—	Magen stark gefüllt, der Mageninhalt reagiert sauer.
6,5	0,338	5,20*)	—	—	—	Magen gefüllt, Mageninhalt reagiert sauer.

Erfahrungen lehrten, fällt die Hauptumwandlung der Kohlehydrate in die dritte bis fünfte Stunde nach der Zuckerzufuhr. Die Versuche 1332 und 1333 ergeben aber ein anderes Bild. Hier wurde 3 Stunden nach der Rohrzuckerverfütterung Dinatriumphosphat gegeben. Die Folge war eine Senkung des Respirationsquotienten, der CO_2, des O_2, der Kalorienbildung. Der Respirationsquotient sinkt von 0,985 auf 0,775, die CO_2-Ausscheidung von 3,33 g auf 2,01 g, der O_2-Verbrauch von 2,45 g auf 1,88 g, die Kalorienproduktion von 8,65 auf 6,38. Die gleichen Erniedrigungen des Respirationsquotienten, der CO_2, des O_2 und der Kalorienbildung finden wir nach Phosphatzufuhr auch in den Versuchen 1334 bis 1339, nur sind hier die Zahlenwerte kleiner.

E. Glykogengehalt der Leber und der Muskeln nach Eingabe von Kohlehydrat allein und von Kohlehydrat + Phosphat.

Um einen tieferen Einblick in das Schicksal des Kohlehydrats bei der Eingabe desselben nebst Phosphat zu erhalten, mußte noch die Glykogenbildung verfolgt werden. Vor der Kohlehydrat- bzw. vor der Kohlehydratphosphateingabe hungerten die Ratten 30 Stunden. Diese Hungerperiode ist unbedingt notwendig, da man sonst bei den Glykogenuntersuchungen ganz unsichere Resultate erhält. Eine Hungerperiode von 16 bis 18 Stunden ist ungenügend, da man danach bei vielen Tieren noch ziemlich erhebliche Glykogenmengen in der Leber findet. Dagegen ist nach 30 Stunden Hunger die Leber allermeistens praktisch glykogenfrei und enthält etwa 0,1 bis 0,3 Proz. Glykogen, die nicht in Betracht fallen. Der Rohrzucker, der Traubenzucker, die Lävulose, das Dioxyaceton wurden mittels Magensonde eingegeben, der Reis wurde von den Tieren freiwillig gefressen. Bei den Versuchen mit Kohlehydrat und Phosphat wurde zuerst das Kohlehydrat, und 1, meistens aber 2 Stunden darauf wurde das Phosphat eingeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte 6 bis 8 Stunden nach der Kohlehydrateingabe, zur Zeit der stärksten Glykogenbildung. Fast durchweg wurde nach der Herausnahme der Leber der Mageninhalt kontrolliert. Der Magen war meistens leer, ein Beweis dafür, daß das Phosphat die Resorption des Kohlehydrats vom Magen aus nicht gehemmt hat. Der Dickdarm war gewöhnlich gefüllt, oftmals gebläht.

Die Glykogenbestimmungen erfolgten nach der Methode von *Pflüger*. Die sofort nach der Tötung herauspräparierte Leber oder Muskulatur wurde in heiße 60proz. Kalilauge gebracht und in bekannter Art weiter verarbeitet. Nach der Hydrolyse wurde der Zucker nach *Bertrand* bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle V zusammengefaßt. Beim Rohrzucker, beim Reis, beim Traubenzucker, beim Dioxyaceton findet man den Leberglykogengehalt nach Phosphatzusatz beträchtlich geringer als ohne Phosphateingabe. Im Durchschnitt setzte das Phosphat den Glykogengehalt der Leber beim Rohrzucker auf etwa ein Drittel, beim Reis auf etwa die Hälfte der normalen Rohrzucker- bzw. Reiswerte herab. Im Mittel ergeben die Rohrzuckerversuche (Versuch 1 bis 4) einen Leberglykogengehalt von 3,33 Proz., der Mittelwert des Leberglykogens bei Eingabe von Rohrzucker + Dinatriumphosphat beträgt dagegen 1,06 Proz. Größer sind die Unterschiede beim Traubenzucker und beim Dioxyaceton. Hier kommt es nach Zugabe von Dinatriumphosphat fast zu keiner Glykogenneubildung, der höchste Wert ist 0,8 Proz. Glykogen in Versuch 16 nach Traubenzucker und Phosphat.

Anders liegen die Verhältnisse bei der *Lävulose*. Hier bringt die Zugabe von Dinatriumphosphat keine Hemmung der Glykogenbildung mit. Die Leber eines Tieres, welches 2 g Lävulose bekam, enthielt 3,60 Proz. Glykogen. In der Leber der Tiere, welche neben 2 g Lävulose 0,75 bis 1,0 g Dinatriumphosphat erhielten, wurden 2,38, 3,94, 3,23 und sogar 5,2 Proz. Glykogen gefunden.

Zusammenfassung.

1. Durch die gleichzeitige Zufuhr von Kohlehydrat und Dinatriumphosphat erleidet der Kohlehydratstoffwechsel wesentliche Veränderungen. In Versuchen an Ratten konnten folgende Abweichungen vom normalen Verhalten des Kohlehydratumsatzes festgestellt werden.

a) Nach Eingabe von Kohlehydrat und Phosphat ist der Respirationsquotient bedeutend niedriger als bei Zufuhr der gleichen Menge Kohlehydrat allein. Während nach Kohlehydrataufnahme der Respirationsquotient ziemlich rasch den Wert von 0,90 bis 1,00 erreicht, steigt er nach Kohlehydratphosphataufnahme nur auf 0,80 bis 0,85, manchmal ist der Respirationsquotient noch niedriger.

b) Die Erhöhung der Kohlensäureproduktion, welche normalerweise die Verarbeitung der Kohlehydrate begleitet, ist nach Aufnahme von Kohlehydrat + Phosphat bedeutend geringer, als nach Aufnahme einer gleich großen Zuckermenge für sich allein.

c) In früheren Versuchen konnte ferner gezeigt werden, daß die Hyperglykämie nach Kohlehydrataufnahme, sowie die Insulinhypoglykämie durch Phosphate und einige andere Salze beeinflußt werden.

2. Durch gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Eingabe von Kohlehydrat und Phosphat (Reis + Dinatriumphosphat, Rohrzucker + Dinatriumphosphat, Traubenzucker + Dinatriumphosphat, Dioxyaceton + Dinatriumphosphat) wird die Glykogenbildung in der Leber stark gehemmt. Das Muskelglykogen wird durch die Phosphatzufuhr nicht regelmäßig beeinflußt.

3. Die Glykogenbildung in der Leber nach Lävulosezufuhr wird durch die Eingabe von Phosphat nicht beeinflußt. Sowohl nach Zufuhr von Lävulose allein, als auch nach Eingabe von Lävulose + Phosphat kommt es in der Leber zu einer sehr reichen Glykogenablagerung.

4. Ebenso wie das Dinatriumphosphat wirken auf den Kohlehydratumsatz das Mononatriumphosphat, sowie einige andere Salze.

5. Auch bei Verfütterung von Eiweiß (rohes Fleisch) und nachträglicher Eingabe von Phosphat findet man sowohl eine Herabsetzung des Respirationsquotienten, als auch eine Verminderung der Kohlensäurebildung. Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß der Umsatz des bei der Eiweißzerlegung gebildeten Zuckers durch das Phosphat beeinflußt wird.

6. Die Versuche beweisen die hohe Bedeutung der anorganischen Salze für den Kohlehydratstoffwechsel und sprechen dafür, daß durch gewisse Elektrolytzusätze das ganze Verhalten des Kohlehydrats im tierischen Stoffwechsel grundlegende Änderungen erfahren kann.

Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. V.

Von

Erik Hägglund und Truls Rosenqvist.

(Aus dem chemischen Institut der Akademie zu Åbo, Finnland.)

(Eingegangen am 9. Juni 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration haben wir die *zellfreie Gärung* studiert, und zwar unter Anwendung von Hefesaft nach *Lebedew*. Exakte Untersuchungen dieser Art sind bekanntlich früher nicht ausgeführt worden. Um die Gärungsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde, wie in der dritten Mitteilung, der *Zuckerverbrauch* gemessen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde als Gärungssubstrat ausschließlich Glucose benutzt. Über die Spaltung der Brenztraubensäure mit Hefesaft bei verschiedener $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration werden wir später berichten.

Wie aus dem experimentellen Teile hervorgeht, *verläuft der Zuckerabbau in dem Gebiet entsprechend* $p_H = 5{,}5$ *bis 8 mit praktisch derselben Geschwindigkeit, vielleicht,* wie besonders aus den Diagrammen hervorgeht, *mit einem schwachen Optimum bei dem Neutralpunkt.*

Was nun den *Verlauf* der Gärungsgeschwindigkeit betrifft, so ist es besonders bemerkenswert, daß in allen Fällen die Gärung nicht sofort einsetzt. Eine Zeitlang merkt man keine oder nur sehr geringe Zuckerabnahme, aber nach dieser Periode setzt die Gärung mit maximaler Geschwindigkeit ein, welche bis zum Ende konstant bleibt. Dasselbe hat man schon früher bei dem Studium der Trockenhefegärungen beobachtet[1]). *Abderhalden* führt diese Erscheinung, „die Induktion", auf das Aufleben der überlebenden Zellen zurück. *Sobotka* vertritt eine ähnliche Meinung: „Jene Zellen, die nicht irreversibler Zerstörung anheimfielen, benötigen, je nach der Intensität der Trocknung, verschiedene Zeiten, um nach Quellung der Membran auch in ihrem

[1]) *Abderhalden* und *Fodor*, Fermentforschung **5**, 138, 1921; *Sabotka*, H. **134**, 1, 1924.

plasmatischen Innern jenen Mindestbetrag von Feuchtigkeit aufzunehmen, der ihr Zymasesystem wieder in Funktion treten läßt." Die Veränderung der einzelnen Zellen durch die Trocknung wird nach *Sobotka* durch die Dauer der Induktion angegeben.

Wie voreilig eine solche Deutung der Induktionserscheinung ist, ergibt sich aus unseren Versuchen. Es ist deutlich, daß die Induktion nicht mit dem Aufleben und der Erweichung der Zellen in Zusammenhang gebracht werden kann, da schon bei der Gärung mit Saft allein diese Erscheinung zutage tritt.

Wir werden in einer späteren Mitteilung dieser Frage nähertreten.

Experimentelles.

Versuch 1.

100 ccm Hefesaft nach *Lebedew*. 100 ccm 5proz. Glucoselösung. 0,15 mol. Phosphatpuffer.

Zeit in Stunden	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Gärlösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Gärlösung in ccm n/10 $KMnO_4$ ausgedrückt
0	7,8	18,6	5,8	17,8
10	7,0	15,4	5,9	0
12	7,7	13,3		
14	7,3	10,1		
16	8,1	6,2		
18	7,6	0,4		
20	7,1	0		

Insgesamt wurden 6,0 ccm konzentrierter Natronlauge zugesetzt, um die Alkalinität aufrechtzuerhalten.

Versuch 2.

Gäransatz wie in Versuch 1.

Zeit in Stunden	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Gärlösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Gärlösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$
0	8,6	18,4	6,2	18,0
2	8,45	—	—	18,0
4	8,34	18,0	6,1	17,9
6	8,2	—	—	18,0
8	8,1	17,1	6,1	17,5
10	7,6	—	—	16,5
12	7,65	15,6	5,9	14,2
14	7,3	—	—	11,5
16	7,2	8,7	5,7	7,6
18	7,3	—	—	3,4
20	7,6	0	5,1	0,6

Insgesamt wurden 2,5 ccm konzentrierter Natronlauge zugesetzt, um die Alkalinität aufrechtzuhalten.

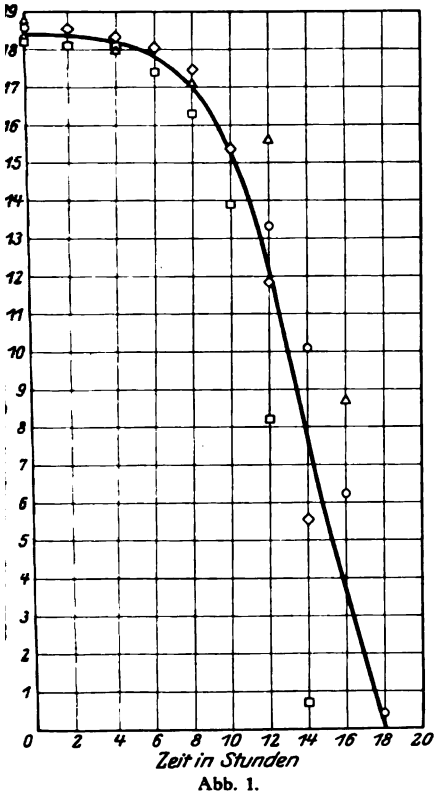


Abb. 1.
Glucosevergärung mit Hefesaft in saurer Lösung p_H = 5,5 bis 6,5.

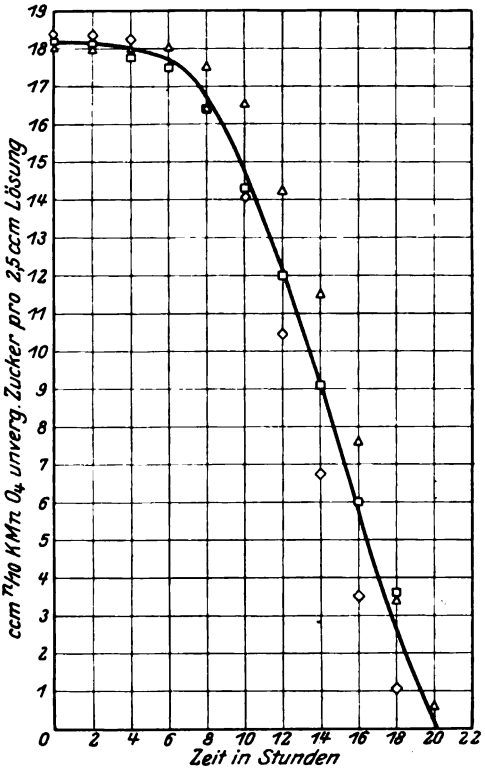


Abb. 2.
Glucosevergärung mit Hefesaft in alkalischer Lösung p_H = 7,5 bis 8.

Versuch 3.

Gäransatz wie in Versuch 1.

Zeit in Stdn.	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Gärlösg. entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Lösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Lösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$
0	8,3	18,7	6,9	18,3	6,1	18,3
2	8,1	18,6	7,0	18,3	6,1	18,3
4	8,0	18,4	7,3	17,8	6,1	18,2
6	7,8	18,1	7,5	17,8	—	17,7
8	7,9	17,5	7,1	16,7	6,0	16,4
10	7,5	15,4	6,8	14,0	—	14,1
12	7,2	11,9	6,5	8,5	5,8	10,5
14	6,9	5,6	6,5	0	—	6,8
16	6,9	0			5,5	3,5
18					—	1,1
20					4,9	0

Insgesamt wurden zu der alkalischen und neutralen Lösung je 3,5 ccm konzentrierter Natronlauge zugesetzt, um die Alkalinität aufrechtzuhalten.

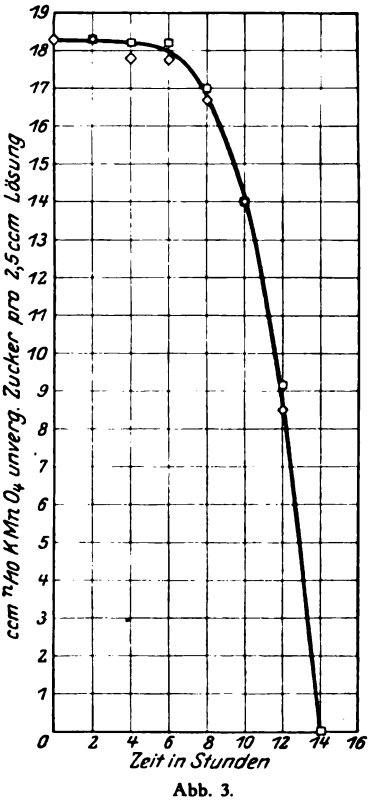


Abb. 3.
Glucosevergärung mit Hefesaft in neutraler Lösung
$p_H = \sim 7$.

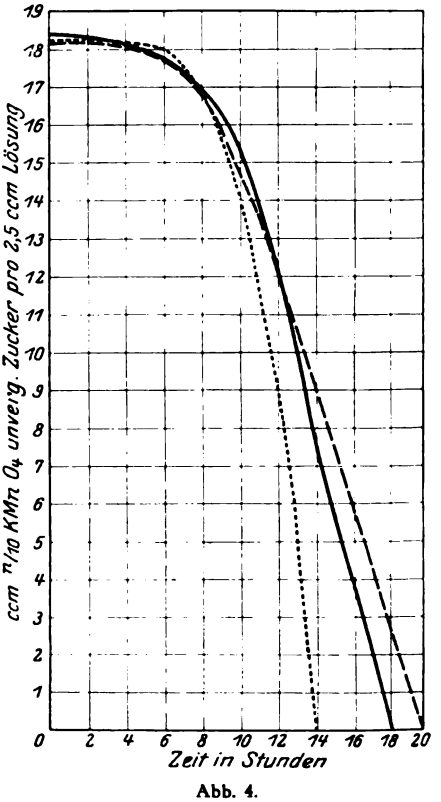


Abb. 4.
Glucosevergärung mit Hefesaft in
----- saurer Lösung
····· neutraler Lösung
—— alkalischer Lösung
(Zusammenstellung).

Versuch 4.

Gäransatz wie in Versuch 1.

Zeit in Stdn.	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Lösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Lösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$	p_H	Unvergorener Zucker in 2,5 ccm Lösung entsprechen ccm n/10 $KMnO_4$
0	7,8	18,2	6,8	18,2	5,7	18,2
4	7,6	18,1	6,7	18,2	5,7	18,1
6	—	17,4	—	18,2	5,8	17,8
8	7,6	16,3	6,8	17,0	5,8	17,5
10	7,2	13,9	6,8	14,0	5,8	16,4
12	6,9	8,2	6,4	9,2	5,7	14,3
14	6,9	0,7	6,6	0	5,6	12,0
16	—	0			5,5	9,1
18					5,2	6,0
20					5,0	3,6

Über quantitative Bestimmung der Lipoide der aus Pferdeplasma ausgesalzten Eiweißkörper.

Von

A. Hugo T. Theorell.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts zu Stockholm.)

(Eingegangen am 9. Juni 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Fähigkeit der Eiweißstoffe, bei Ausfällung aus einer Lösung verschiedene Körper mit sich zu reißen, ist eine schon lange bekannte Tatsache. Natürlich hat man eine solche gegenseitige Fällung zu erwarten, wenn man aus dem Blutplasma, das ja die verschiedensten wasserlöslichen und wasserunlöslichen Stoffe enthält, die Eiweißkörper durch fraktionierte Sättigung mit Ammoniumsulfat entfernt.

Der Gruppe der wasserunlöslichen Stoffe des Plasmas gehören die Lipoide an; es ist noch nicht aufgeklärt, wie sie im Plasma klar gelöst vorkommen können, denn kolloidale Wassersuspensionen der Lipoide von der Konzentration des Plasmas sind milchweiß. Mehrere Verfasser meinen, daß die Eiweißstoffe für die klare Lösung der Lipoide eine Rolle spielen, entweder durch eine chemische Verbindung Lipoid—Eiweiß, wie sie z. B. von *I. Bang* (1) in der Peritonealflüssigkeit zwischen Cholesterin und Euglobulin nachgewiesen ist, oder möglicherweise durch eine schutzkolloidale Wirkung der Eiweißstoffe auf die Lipoide. Es läßt sich auch denken, daß diese aufeinander schützend wirken, Phosphatide auf Cholesterin z. B.

Wie dem auch sei, kann man im aus Plasma ausgesalzten Eiweiß bedeutende Lipoidmengen zu finden erwarten. Indessen gibt es in der Literatur nur spärliche Angaben in dieser Frage. *Matthews* behauptet in seinem Lehrbuch, das ausgesalzte Globulin sei von Lecithin verunreinigt. Außer dem rein chemischen Interesse, das eine Analyse der mit den Eiweißfraktionen ausgefallenen Lipoide beanspruchen dürfte, kommt nunmehr ein praktisches Moment hinzu. *R. Fåhraeus* hat in seiner großen Arbeit „The Suspension-Stability of the Blood"

die erniedrigte Suspensionsstabilität bei den verschiedensten pathologischen Zuständen und bei der Gravidität in prinzipieller Übereinstimmung mit früheren Autoren (2) durch eine „Globulinvermehrung" im Blute zu erklären versucht. Die Einwirkung verschiedener Fraktionen der Eiweißkörper im Plasma auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten hat er durch den folgenden Versuch gezeigt: Aus Pferdeplasma wurden durch 27, 50 bzw. 100 Proz. Sättigung mit Ammoniumsulfat das Fibrinogen, das Globulin und das Albumin ausgefällt. Die abfiltrierten Niederschläge wurden dialysiert, mit Rücksicht auf Stickstoff gleich konzentriert und mit Pferdeplasma isotonisch gemacht. Nach der Suspension gewaschener Blutkörperchen in den drei Eiweißlösungen wurde die Senkungsgeschwindigkeit im Fibrinogen am größten, im Albumin am geringsten gefunden. *Fåhraeus* weist auf die verschiedene Viskosität der Lösungen hin: Je größer die Viskosität, je größer die Senkungsgeschwindigkeit.

Linzenmeier (3) hat die Untersuchungen von *Fåhraeus* wiederholt und besondere Versuche über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Blutkörperchen gemacht, der von *Fåhraeus* u. a. ein großer Einfluß auf die Suspensionsstabilität früher zugeschrieben worden war. Beiläufig sei hier bemerkt, daß *Brinkman-van Dam* (4) zu beweisen versuchen, daß Cholesterin die elektrische Isolation der Blutkörperchen bedinge. Ein interessantes Ergebnis teilt *Linzenmeier* mit: die Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen in Fibrinogen- und Globulinlösungen ist größer, in Albuminlösungen aber kleiner als diejenige in physiologischer Kochsalzlösung, obwohl die Albuminlösung viel visköser als die letztere ist. *Westergren* (5) hat gezeigt, daß eine Bluteindickung mit vermehrter Viskosität durch Stase die Senkungsgeschwindigkeit unbeeinflußt läßt. *Kürten* (6) (4) ist auf Grund einiger experimenteller Untersuchungen der Ansicht, daß die auch in anderer Hinsicht antagonistisch wirkenden Lipoide Lecithin und Cholesterin auch für die Suspensionsstabilität eine entscheidende Bedeutung haben. Durch geringe Zusätze einer wässerigen Cholesterinsuspension zu Blut erhielt er eine maximale Senkungsgeschwindigkeit. Eine wässerige Lecithinsuspension hatte eine antagonistische Wirkung. *Ley* (7) versuchte vergebens diese Resultate zu bestätigen. *Kürten* weist für die Erklärung dieser Verschiedenheit auf die wenig überzeugende Möglichkeit hin, *Ley* hätte eine andere Modifikation von Cholesterin gebraucht. *György* (8) erhielt mit einer Lecithinsuspension eine stabilisierende Wirkung, mit einer Cholesterinsuspension überhaupt keine.

Zu diesen divergierenden Angaben möchte nur hinzugefügt werden, daß natürlicherweise die Herstellungsmethode der Suspensionen, die Zeit- und Temperaturverhältnisse usw. eine große Rolle für das Resultat spielen könnten.

Die obigen Überlegungen zeigen, daß eine quantitative Lipoidbestimmung in den drei hauptsächlichen Eiweißfraktionen des Plasmas und besonders die Ermittlung des Verhältnisses Cholesterin : Lecithin von Interesse für die Frage über die Ursache der Variationen der Suspensionsstabilität des Blutes sein würde.

Experimentelles.

3000 ccm klarem, frischem, möglichst hämoglobinfreiem Pferdeplasma, in welchem die Koagulation durch Zusatz von Ammoniumoxalatlösung verhindert worden war, wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu 27 Proz. Sättigung beigemischt. Der entstandene Niederschlag von Fibrinogen wurde scharf abzentrifugiert: 30 Minuten bei 6000 Touren. Der an den Wänden haftende Niederschlag wurde durch neues Zentrifugieren mit einer 27proz. gesättigten Ammoniumsulfatlösung gewaschen; die Waschflüssigkeit wurde weggegossen und der Niederschlag möglichst quantitativ aufgesammelt. Die Mutterlauge wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 50proz. Sättigung versetzt und die ausgefallenen Globuline in derselben Weise wie das Fibrinogen abzentrifugiert. Die Waschung wurde jetzt mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgeführt, die Waschflüssigkeit wie früher weggegossen. Zuletzt wurde die Mutterlauge mit Ammoniumsulfat in Substanz gesättigt, die Fällung abfiltriert und auf dem Filtrum mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung einmal gewaschen.

In den zwei ersten Waschflüssigkeiten ging selbstverständlich ein wenig Eiweiß verloren.

Als Kontrolle wurden 100 ccm desselben Plasmas genommen.

Um eine Oxydation der Phosphatide soweit als möglich zu vermeiden, wurden die Niederschläge und das Plasma in reiner Stickstoffatmosphäre oder im Vakuum aufbewahrt.

Die gewonnenen Eiweißfraktionen wurden unter einem Druck von reinem Stickstoff (250 mm) dialysiert.

Im Laufe von 3 bis 4 Tagen waren die Eiweißkörper gelöst und die Lösungen wurden während der Dialyse so konzentriert, daß das gesamte Volumen der Lösungen ungefähr 700 ccm war. Die Dialyse wurde unterbrochen, als das Fibrinogen und das Globulin infolge der Salzarmut teilweise ausfielen. Die Fibrinogenlösung war dann hellrot, die Globulinlösung dunkelgrün; beide hatten eine Konsistenz wie dickes Öl. Die Albuminlösung war schokoladenbraun und etwas leichtfließender.

Zur Trocknung wurde nach *Fränkel-Elfers* Natriumsulfat verwendet. In diesem Zusammenhang sei hervorgehoben, daß eine in *Abderhaldens* Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Teil VI, Abt. 1, S. 5, 1925, empfohlene Trocknungsmethode mit Na_2HPO_4 statt Na_2SO_4 für Lipoidextraktion unverwendbar ist. Das erstere Salz reagiert ja alkalisch, löst sich bei der Extraktion im Soxhlet in der Extraktionsflüssigkeit, die ja immer wasserhaltig wird, und bewirkt eine Verseifung der Phosphatide und Neutralfette, verwandelt die freien Fettsäuren in Seifen und ruft außerdem eine ungeheuer starke Mißfärbung hervor, die teilweise in den absoluten Äther übergeht und jede

kolorimetrische und spektrophotometrische Bestimmung der Cholesterinstoffe unmöglich macht.

Als die Eiweißlösungen mit 70 Proz. wasserfreiem Natriumsulfat gemischt waren, wurden sie einige Tage im Vakuum aufbewahrt, wobei sie kontinuierlich Wasser abgaben. Nach Verlauf dieser Zeit waren die Lösungen zu steinharten, spröden Kuchen verwandelt, die in einer Kugelmühle zerteilt wurden. Die in derselben Weise wie oben getrockneten 100 ccm Plasma mußten wegen Mangel an Extraktionsapparaten bedeutend länger, ungefähr 2 Monate, im Vakuum verweilen. Das getrocknete Plasma zerfiel während der langen Zeit im Vakuum spontan in einen feinen Staub.

Da etwas vom Eiweißsalzstaub an den Kugeln haften blieb, wurde der Staub und die Kugel mit anhaftendem Staube gewogen, die Kugel gewaschen und trocken nochmals gewogen. Der übrigens kleine Verlust wurde in Rücksicht genommen.

Von der quantitativen Extraktion konnte a priori erwartet werden, daß sie sehr zeitraubend werden würde (9) (10). Sie wurde in Stickstoffatmosphäre in der folgenden Weise ausgeführt: Die Rückflußkühler der Soxhletapparate wurden mittels Gummischläuche miteinander zu einem einzigen Ausfluß vereinigt und mit dem von Stickstoff erfüllten oberen Raume einer großen Flasche verbunden, die zur Hälfte mit gekochtem Wasser beschickt war. Die Flasche stand durch einen Heber in Verbindung mit einer zweiten Flasche, die gleichfalls zur Hälfte mit Wasser, von Paraffinöl bedeckt, gefüllt war. Diese zweite Flasche stand mit der Außenluft in offener Kommunikation; das Paraffinöl hinderte die Diffusion der Luft ins Wasser. Die Luft wurde zuerst durch Kochen der Extraktionsflüssigkeiten aus den Apparaten vollständig vertrieben und dann erst die Verbindung Kühler—Flasche hergestellt. Beim Erkalten der Apparate kondensierten sich die Dämpfe, Stickstoff wurde von der ersten Flasche in die Apparate gesogen und eine entsprechende Menge Wasser floß durch den Heber von der zweiten in die erste Flasche.

In dieser Weise wurden 66,02 Proz. des Fibrinogens, 42,50 Proz. des Globulins, 33,58 Proz. des Albumins folgendermaßen extrahiert:

Tabelle I.

Extraktionsflüssigkeit	Zeit in Stunden
Äther	2 × 24
3 Teile Alkohol + 1 Teil Äther .	2 × 24
Alkohol	2 × 24
„	3 × 24
Chloroform	4 × 24

Wegen der nicht zu vermeidenden Feuergefahr wurde täglich nur 6 bis 10 Stunden das Wasserbad unter den Apparaten gewärmt; die Extraktion findet ja doch während der ganzen Zeit statt, obschon bisweilen bei etwas niedriger Temperatur.

Die Rückstände der Chloroformextraktionen wogen in allen Fällen nur wenige Milligramme; die Extraktion im Soxhlet wurde auf diesem Punkte unterbrochen. Alle Extrakte von jedem Eiweißkörper wurden vereinigt und wasserfreies Natriumsulfat hinzugefügt. Nach 24stündigem Verweilen in Stickstoffatmosphäre wurden die Extrakte in Fraktionierkolben hineinfiltriert, die Filtra mit absolutem Äther gewaschen und die Flüssigkeiten unter vermindertem Druck bei etwas erhöhter Temperatur eingedampft. Stickstoff wurde dabei durch die Lösungen geleitet. Die wasserfreien Rückstände in den Kolben wurden in Chloroform aufgenommen, in 100-ccm-Meßkolben hineingebracht und diese mit dem zur Auswaschung der Destillationskolben benutzten Chloroform bis zur Marke gefüllt. Das Plasmaextrakt wurde genau in derselben Weise hergestellt und in einem 50-ccm-Kolben mit Chloroform aufgenommen.

Um das Gewicht der Lipoidextrakte zu bestimmen, wurde die Trockensubstanz in Teilen der Chloroformlösungen bestimmt. Diese Lösungen von Fibrinogen-, Globulin-, Albumin- und Plasmaextrakt werden unten A_I, A_{II} bzw. A_{III} genannt.

Tabelle II.

Lösung	ccm	Trockensubstanz g	Trockensubstanz auf die ganze Fraktion g	Trockensubstanz pro g Eiweiß g
A_I	2	0,0248	1,88	0,0555
A_{II}	4	0,0270	1,59	0,0201
A_{III}	2	0,0272	4,05	0,0656

Für Plasma wurde diese Bestimmung nicht ausgeführt, weil die Extraktion des Plasmas sehr unvollständig ausgefallen war.

In kleinen Proben der extrahierten Massen wurden jetzt quantitative Eiweißbestimmungen ausgeführt. Abgewogene Mengen wurden mit einer kochenden Mischung von *Sörensens* Reagens und Wasser, dann mit Wasser zum Verschwinden der Sulfatreaktion gewaschen und zuletzt mit Alkohol und Äther getrocknet. Die Filtrate waren eiweißfrei.

Die Doppelbestimmungen ergaben sehr befriedigende Werte. Durch das Waschen der ausgesalzten Niederschläge scheinen nach den obigen Bestimmungen etwa 5 Proz. vom Eiweiß verloren gegangen zu sein.

Tabelle III.

Präparat	Eiweiß g	Eiweiß im Plasma Proz.
Ganze Fibrinogenfraktion	33,9	1,13
„ Globulinfraktion	79,3	2,64
„ Albuminfraktion	61,7	2,06
Gesamteiweiß	174,9	5,83
3000 ccm Plasmaeiweiß	184,2	6,14

Nach *Thaysen* (9) ist es unmöglich, eine quantitative Extraktion von Plasma und Serum im Soxhlet zu erhalten. Deshalb wurde das extrahierte Eiweiß durch einstündiges Kochen mit 20proz. Natronlauge zerlegt, wobei nur ein winziger Teil der Cholesterinester verseift werden soll. Die entstandenen braunen Lösungen wurden mit Äther in Scheidetrichtern sechs- bis siebenmal geschüttelt, die Ätherportionen vereinigt und einige Male mit schwach alkalischem Wasser (um die Hydrolyse der mitgeschleiften Seifen zu verhindern), dann mit destilliertem Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen. Die ersten Waschwässer wurden mit der Mutterlauge der ersten Extraktion zusammengenommen, mit Salzsäure sauer gemacht, mittels mehrfach erneutem Äther extrahiert und zuletzt die vereinigten Extrakte zur neutralen Reaktion mit Wasser gewaschen. Nach Verdampfung des Äthers wurden die verschiedenen Rückstände in absolutem Äther aufgenommen, filtriert, die Filtra gewaschen, die Lösungen abgedampft und die Rückstände gewogen. Die Gewichte wurden auf die ganzen Eiweißfraktionen und auf 3000 ccm Plasma umgerechnet.

Bezeichnungen:

B_I^a, B_{II}^a, B_{III}^a, P_b^a = Ätherextrakte aus alkalischer Lösung der zerlegten bzw. Fraktionen und des Plasmas.

B_I^s, B_{II}^s, B_{III}^s, P_b^s = Ätherextrakte aus saurer Lösung der zerlegten bzw. Fraktionen und des Plasmas.

Tabelle IV.

Extrakt (aus alkalischer Lösung)	Gewicht auf die ganze Fraktion bzw. auf 3000 ccm Plasma umgerechnet g	Gewicht des Extraktes pro g Eiweiß g
B_I^a	0,0456	0,001 35
B_{II}^a	0,0710	0,000 895
B_{III}^a	0,1467	0,002 38
P_b^a	2,34	0,012 7

Tabelle V.

Extrakt (aus saurer Lösung)	Gewicht auf die ganze Fraktion bzw. auf 3000 ccm Plasma umgerechnet g	Gewicht des Extraktes pro g Eiweiß g
B_I^s	0,0418	0,001 23
B_{II}^s	0,0905	0,001 14
B_{III}^s	0,2324	0,003 77
P_b^s	3,023	0,017 5

Aus den obigen Tabellen geht hervor, daß die Extraktion der Fraktionen im Soxhlet ziemlich vollständig, diejenige des Plasmas dagegen sehr unvollständig gewesen ist.

Phosphorbestimmungen in den A-Lösungen wurden dann nach *Pregl* gemacht.

Tabelle VI.

Lösung	ccm	mg P	mg P pro ccm im Mittel	mg P in der ganzen Fraktion bzw. auf 3000 ccm Plasma
A_I	1,0	0,1470	0,1462	21,12
	3,0	0,4358		
A_{II}	2,0	0,1319	0,0654	22,20
	4,0	0,2593		
A_{III}	0,5	0,1208	0,2411	69,87
	1,5	0,3609		
P_a	2,0	0,0149	0,0075	11,25
	8,0	0,0596		

Auffallend ist der hohe P-Gehalt des Albuminextraktes und die sehr niedrige P-Menge im Plasmaextrakt. Von den nach Zerlegung des Eiweißes mit Natronlauge gewonnenen Fettsäuren kann natürlich ein größerer oder geringerer Teil von früher nicht extrahierten Phosphatiden stammen, wahrscheinlich ein großer Teil, da ja ziemlich feste chemische Verbindungen Phosphatid-Eiweiß bekannt sind, während für die gewöhnlichen Fette solche, soweit ich kenne, nicht nachgewiesen sind. Die nach dem Kochen des Plasmas mit Natronlauge erhaltenen Fettsäuren reichen indessen gut hin, um das Defizit im Phosphatidgehalt der P_a-Lösung zu erklären. Wie später gezeigt wird, waren auch die anderen Lipoide im Soxhlet aus dem Plasma sehr mangelhaft extrahiert worden. Den Grund hierzu kann ich nicht angeben. Möglicherweise hat die längere Trocknungszeit eine Rolle gespielt. Aus den ausgesalzten Eiweißfraktionen dagegen wurde der weit überwiegende Teil schon im Soxhlet (A-Lösungen) extrahiert.

Bestimmung der totalen Menge der Fettsäuren in den A-Lösungen.

Nach den Phosphorbestimmungen wurden die Reste der A-Extrakte mit 5proz. alkoholischer Kalilauge während einer Stunde verseift. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen mit Hilfe von Alkohol quantitativ in Scheidetrichter übergeführt, mit dem gleichen Volumen Äther gemischt und geschüttelt; Wasser wurde dann bis zur Trennung der Schichten zugesetzt. Die wässerigen Lösungen wurden noch fünf- bis sechsmal mit Äther extrahiert und die vereinigten Ätherextrakte einige Male mit schwach alkalischem Wasser, dann mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen. Der Äther wurde auf dem Wasserbad schnell verjagt und die Rückstände in je 100 ccm Chloroform quantitativ gelöst. Die untere Schicht der ersten Trennung zusammen mit den ersten Waschwässern wurden durch Salzsäure sauer gemacht und die ausgefallenen Fettsäuren im Scheidetrichter mit Äther energisch extrahiert, die Extrakte mit Wasser gewaschen. Die Rückstände nach dem Verdunsten der gewaschenen Ätherextrakte wurden noch durch ihre Lösung in einem kleineren Volumen absoluten Äthers und Filtrierung gereinigt. Nach Verdampfung des Äthers wurden folgende Werte erhalten:

Tabelle VII.

Lösung	ccm	Darin Fettsäuren g	Totalfettsäuren in den ganzen Fraktionen und auf 3000 ccm Plasma g	Fettsäuren pro g Eiweiß g
A_I	89	0,5141	0,8341	0,002 46
A_{II}	89	0,0829	0,3554	0,000 448
A_{III}	89	0,5349	1,9570	0,003 17
P_a	39	0,0228	0,8790	0,000 477

Wie man nach den P-Bestimmungen erwarten konnte, wurden in $A_I + A_{II} + A_{III}$ mehr Fettsäuren gefunden als in P_a.

Bestimmung der Cholesterinstoffe.

Für die quantitative Analyse der Cholesterinstoffe erbot sich zunächst *Windaus* (11) Digitoninmethode, für das Oxycholesterin *Lifschütz'* (12) spektrometrisches Verfahren. Die erste Methode liefert gute Resultate.

Während der Analyse zeigte es sich, daß die Extrakte an Cholesterinester ziemlich arm waren; für ihre Ermittlung war eine Bestimmung mit *Liebermann-Burchards* Reaktion in der Hauptsache nach *Lifschütz* daher am geeignetsten.

Indessen habe ich an der Methode bedeutende Modifikationen machen müssen.

Erstens verwandte ich statt des von *Lifschütz* empfohlenen Vergleichsspektroskops einen Spektrophotometer vom *Hüfner*schen Typus. Die Vorteile sind offenbar; man kann eine beliebige Anzahl von Ablesungen machen und dadurch die Genauigkeit sehr wesentlich erhöhen;

man vermeidet ganz die Verdünnung mit Eisessig, und man braucht nur ein für allemal ein wenig Testsubstanz für die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten herzustellen.

Weiter schien es durchaus notwendig zu sein, den Verlauf der verschiedenen Reaktionen etwas näher zu untersuchen.

Versuchstechnik. Die Reaktionsmischungen wurden immer nach *Lifschütz'* Vorschriften angefertigt; also für *Liebermann-Burchards Reaktion.* Substanz in 1 Vol. Chloroform gelöst + 2 Vol. Essigsäureanhydrid + 0,25 Vol. Eisessig-Schwefelsäuremischung nach *Lifschütz,* 9 Vol. Eisessig + 1 Vol. konzentrierter Schwefelsäure.

Für *Liebermanns Reaktion.* Substanz in 1 Vol. Eisessig oder Essigsäureanhydrid gelöst, sonst genau wie oben.

Für *Lifschütz' Reaktion.* Substanz in 1 Vol. Chloroform gelöst + 2 Vol. Eisessig + 8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure + 2 Tropfen Eisessiglösung mit 5 Proz. Eisenchlorid. Zu dieser Reaktion verwandte ich immer dieselben Pipetten. Die 8 + 2 Tropfen machten fast genau 0,25 ccm aus.

Die ermittelten Werte des Extinktionskoeffizienten sind sämtlich für 1 mg Testsubstanz in irgendwelcher von obigen Mischungen (3,25 ccm) der größeren Übersichtlichkeit wegen umgerechnet.

Als Testsubstanzen verwendete ich Cholesterin, aus Gallensteinen hergestellt, mehrfach aus Alkohol umkristallisiert, vom Schmelzpunkt 146° C.

Reines Cholesteryloleat wurde aus Pferdeplasma nach den Anweisungen von *Hürthle* (13) hergestellt. Der Schmelzpunkt war nach mehreren Umkristallisationen konstant 41° C. Das Präparat bestand mikroskopisch ausschließlich aus Nadeln, gab mit Digitonin auch nach 24 Stunden in der Kälte keinen Niederschlag und enthielt also kein freies Cholesterin.

Bei der Herstellung des reinen Oxycholesterins nach *Lifschütz* wurde eine weiße Verunreinigung erhalten, die in Benzol unlöslich war und sich also leicht entfernen ließ. Nach einigen Schwierigkeiten gelang es mir, in zwei Darstellungen Präparate mit übereinstimmenden chemischen und physikalischen Eigenschaften zu erhalten. Die Präparate bildeten einen hellgelben, klar durchsichtigen Lack, der auf dem Wasserbad eine weiche, fadenziehende Masse bildete. In Methylalkohol und Benzin waren sie leicht und klar löslich. Die „kombinierte Cholestolreaktion" auf gewöhnliches Cholesterin fiel negativ aus. Bei der Ausführung der Essigschwefelsäurereaktion traten die von *Lifschütz* beschriebenen Farben prachtvoll auf, ebenso wie das charakteristische Absorptionsspektrum mit dem scharfen Bande im roten Gebiet. In diesem Streifen wurde der Extinktionskoeffizient in mehreren Bestimmungen gemessen. Dabei, wie in allen folgenden Messungen mit

dieser Reaktion, wurde folgende Technik befolgt: Testsubstanz in 1 ccm Chloroform gelöst + 2 ccm Eisessig + 8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure wurden zusammen gemischt und während 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit wurden die zwei Tropfen Eisenchlorid-Eisessiglösung hinzugefügt, dann 1 bis 2 Minuten abgewartet, die Flüssigkeit in den *Schulze*schen Trog gegossen und abgelesen. In dieser Weise wurde eine Reihe von Bestimmungen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Präparate gemacht.

Der Extinktionskoeffizient von 1 mg in der oben beschriebenen Reaktionsmischung (3,25 ccm) wird hiernach ε bezeichnet.

Für das erste Präparat $\varepsilon = 3{,}22$
Für das zweite Präparat $\varepsilon = 3{,}26$
Mittel . . . $\varepsilon = 3{,}24$

Die *Liebermann-Burchard*sche Reaktion auf Cholesterin, Oxycholesterin und Cholesterin-Ölsäureester habe ich bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Konzentrationen näher untersucht.

Versuch 1. 1 Vol. 0,5prom. Chloroformlösung von Cholesterin + 2 Vol. Essigsäureanhydrid + 0,25 Vol. Essigsäure-Schwefelsäuremischung. Temperatur 14,5° C.

Zeit in Minuten nach der Mischung:	40	60	75	90	120	150	180	300
ε:	0,768	1,089	1,274	1,360	1,477	1,556	1,472	1,163

Versuch 2. Reaktionsmischung wie im vorigen Versuch. Temperatur 18,6° C.

Minuten:	20	40	60	90	130	180	240
ε:	0,715	1,204	1,433	1,553	1,583	1,477	1,360

Versuch 3. Reaktionsmischung wie oben, 35° C.

Minuten:	5	10	15	20	25	30	45	60	75
ε:	0,715	1,451	1,576	1,445	1,315	1,188	1,001	0,812	0,701

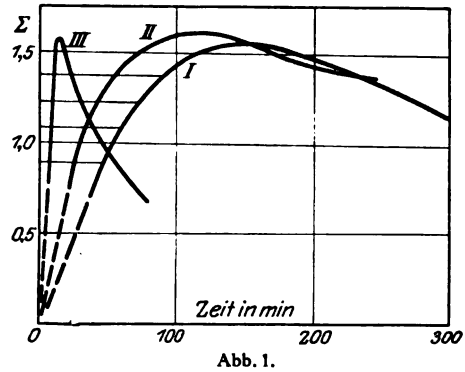


Abb. 1.
I. 0,5 Prom. Chloroformlösung Chol. 14,5° C.
II. 0,5 „ „ „ 18,6° C.
III. 0,5 „ „ „ 35,0° C.

Eine ungefähre Vorstellung über die Einwirkung der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit konnte dadurch erhalten werden, daß horizontale, die Kurven schneidende Linien gezogen und die Verhältnisse der den Schnittpunkten entsprechenden Werte an der Abszisse berechnet wurden. Eine solche Vergleichung der Versuche 1 und 2 ergab in vier verschiedenen Fällen (s. Abb. 1) annähernd denselben Wert: 1,75 als Verhältnis der Abszissen. Wenn man annimmt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur in geometrischer Reihe wächst (s. z. B. *Nernst*, Theoretische Chemie, 8. bis 10. Aufl., S. 751, Beispiel), so ergibt sich die folgende Gleichung:

$$x^{18,6-14,5} = 1{,}75, \quad \text{wo } x = \frac{\text{Reaktionsgeschwindigkeit bei } T^0 + 1^0\,\text{C}}{\text{Reaktionsgeschwindigkeit bei } T^0\,\text{C}}$$

$$x = 1{,}15.$$

Für jeden Grad Celsius Temperaturerhöhung wird also die Reaktionsgeschwindigkeit mit 1,15 multipliziert.

Versuch 4. 1 Vol. 1prom. Chloroformlösung von Cholesterin + die Reagenzien wie oben. Temperatur 35° C.

Minuten:	5	10	15	20	25	30	40	50	60	75
ε:	0,681	1,439	1,611	1,521	1,341	1,233	1,049	0,915	0,809	0,719

Aus einem Vergleich dieses Versuchs mit dem Versuch 3 geht hervor, daß die Werte des ε innerhalb der Fehlergrenzen miteinander übereinstimmen. Der Extinktionskoeffizient ist also in jeder Phase der Reaktion der Konzentration des Cholesterins proportional.

Hervorzuheben ist, daß die roten und blauen Reaktionsstadien immer vor der ersten Ablesung abgelaufen sind.

Das Maximum ist immer nach 15 Minuten bei 35° C erreicht. Gerade bei diesem Punkte wurde daher der Extinktionskoeffizient unter Anwendung verschiedener Konzentrationen etwas genauer bestimmt. Als Mittel von sechs Bestimmungen wurde $\varepsilon = 1{,}578 \pm 0{,}0085$ erhalten.

Dieser Wert gilt, gleichwie die in obigen Versuchen mitgeteilten, für 1 mg kristallisiertes Cholesterin mit 1 Mol. Kristallwasser. Für das wasserfreie Cholesterin wäre unter Voraussetzung der Formel $C_{27}H_{44}O$ der Wert $\varepsilon = 1{,}652 \pm 0{,}0089$ zu setzen.

Die spektrale Empfindlichkeit der *Lifschütz*schen Essigsäure-Schwefelsäurereaktion ist also nur ungefähr zweimal so groß wie die der *Liebermann-Burchard*schen, innerhalb der unten näher bestimmten Spektralbereiche; *Lifschütz* gibt leider keine Wellenlängen an, aber nach seiner Beschreibung läßt sich annehmen, daß er fast genau in derselben Gegend des Spektrums wie in dieser Arbeit seine Bestimmungen gemacht hat. Als Verhältnis zwischen der spektralen Empfindlichkeit der *Lifschütz*schen Reaktion und der der *Liebermann-Burchard*schen gibt er nach Bestimmung der betreffenden Minimalabsorptionen 3 bis 4 an.

Als eine Kontrolle von *Lifschütz*' Behauptung, daß die *Liebermann-Burchard*-Reaktion mit Cholesterin und mit Oxycholesterin identisch verlaufe, wurden folgende Versuche ausgeführt.

Versuch 5. 0,5prom. Chloroformlösung von Oxycholesterin + Reagenzien wie oben, 17,5° C.

Minuten:	5	10	15	20	25	35	45	60	75	90	105	120
ε:	1,496	1,583	1,604	1,569	1,522	1,390	1,308	1,236	1,178	1,112	1,056	0,996

Versuch 6. Reaktionsmischung wie Versuch 5, 35° C.

Minuten:	5	10	15	20	30	40	60
ε:	1,583	1,313	1,188	1,041	0,874	0,742	0,608

Versuch 7. 1 prom. Oxycholesterinlösung, sonst wie im Versuch 6.

Minuten:	5	10	15	20	30	40	60	80
ε:	1,630	1,316	1,174	1,006	0,874	0,726	0,618	0,549

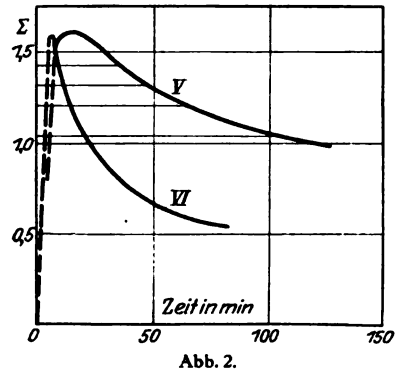


Abb. 2.
V. 0,5 Prom. Chloroformlösung Oxychol. 17,5° C.
VI. 0,5 „ „ „ 35,0° C.

Die Beschleunigung der Reaktion durch Wärme wird in der oben angegebenen Weise ermittelt. In den fünf eingezeichneten Höhen wird erhalten bzw. 4,0, 4,0, 4,4, 4,9, 5,3. Mittel 4,5.

Also $C^{35-17,5} = 4,5$; $C = 1,09$.

Liebermann-Burchards Reaktion auf Oxycholesterin scheint somit von der Wärme etwas weniger beschleunigt zu werden, als es für Cholesterin der Fall war.

Aus einer Zusammenstellung der Versuche 3 und 6, Abb. 3, geht hervor, daß die hier gewonnenen Resultate mit den *Lifschütz*schen durchaus un-

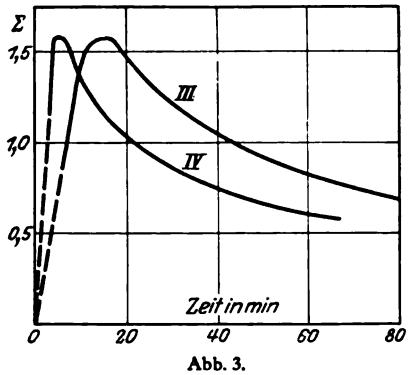


Abb. 3.
III. 0,5 Prom. Chloroformlösung Chol. 35,0° C.
IV. 1,0 „ „ „ 35,0° C.

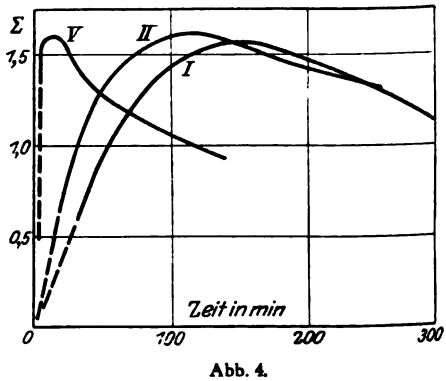


Abb. 4.
I. 0,5 Prom. Chloroformlösung Chol. 14,5° C.
II. 0,5 „ „ „ 18,6° C.
V. 0,5 „ „ Oxychol. 17,5° C.

vereinbar sind; er behauptet mit großer Schärfe und meint auch mit seiner Methodik bewiesen zu haben, daß die *Liebermann-Burchard*-Reaktion mit Cholesterin und Oxycholesterin identisch seien. Es ist etwas schwer zu verstehen, wie er seine Resultate gewonnen hat, denn die Reaktion verläuft ja sowohl bei 35° C (Abb. 3) wie auch bei Zimmertemperatur (Abb. 4) viel schneller mit Oxycholesterin.

Nach 15 Minuten bei 35° C war das Maximum im Cholesterinversuch $\varepsilon = 1{,}652$ erreicht; bei diesem Zeitpunkt ist ε für Oxycholesterin bis auf 1,18 abgefallen. Gerade dieser Wert wurde mehrfach in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Als Mittel der sehr gut übereinstimmenden Messungen wurde $\varepsilon = 1{,}18$ gefunden. Es ist also meiner Meinung nach unmöglich, ohne weiteres das Totalcholesterin mittels der *Liebermann-Burchard*schen Reaktion zu bestimmen. Dasselbe gilt natürlich auch für die *Authenrieth*sche kolorimetrische Methode. Einen richtigen Wert des Gesamtcholesterins bei Gegenwart von Oxycholesterin erhält man nach der quantitativen Bestimmung des letzteren vermittelst der Essigsäure-Schwefelsäurereaktion *unter Berücksichtigung der verschiedenen Extinktionskoeffizienten* 1,652 und 1,18 nach exakt 15 Minuten bei 35° C. Vor dem Zusetzen der Schwefelsäure soll darum die Mischung Chloroform-Essigsäureanhydrid auf 35° C aufgewärmt sein.

Der schnellere Verlauf bei der Oxycholesterinreaktion scheint mir möglicherweise darauf hinzudeuten, daß die Oxydation des Cholesterins im Reaktionsgemisch über Oxycholesterin als eine erste Stufe verläuft.

Die oben erwähnten Cholesterinester (wohl fast ausschließlich das Oleat) *gaben dieselben Kurven wie das freie Cholesterin*. Im Maximum war ε pro 1 mg wasserfreies, freies Cholesterin = 1,650.

Liebermanns Reaktion.

Versuch 8. a mg Cholesterin in a ccm Eisessig frisch gelöst + 2a ccm Essigsäureanhydrid + 0,25a ccm Essigsäure-Schwefelsäuremischung. 16,5° C.

Minuten:	60	120	180	240	400
ε:	0,483	0,742	0,838	0,813	0,663

Versuch 9. Reaktionsmischung wie im Versuch 8. 35° C.

Minuten:	20	40	60	90	120
ε:	0,781	0,845	0,777	0,640	0,547

Bei dieser Reaktion war also ε max. ungefähr = 0,84 (für wasserhaltiges Cholesterin), woran man sich z. B. bei einer spektrophotometrischen Analyse des nur in Eisessig löslichen Cholesterindigitonids erinnern muß. Ich habe mich übrigens überzeugt, daß das Digitonid denselben ε wie freies Cholesterin gibt. *Lifschütz* behauptet, daß diese Reaktion gegen Wärme wenig empfindlich sei, was mit den obigen Bestimmungen sehr schlecht übereinstimmt, da bei Zimmertemperatur das Maximum erst nach 3 bis 4 Stunden, bei 35° C schon nach 40 Minuten erreicht wurde.

Auch *Liebermanns* Reaktion verlief unter Anwendung von Oxycholesterin viel schneller als mit Cholesterin, wie folgende Versuche zeigen.

Versuch 10. 1 Vol. 1prom. Oxycholesterinlösung in Eisessig (frisch bereitet) + 2 Vol. Essigsäureanhydrid + 0,25 Vol. Eisessig-Schwefelsäuremischung. 16,5° C.

Minuten:	4	8	12	16	20	30	45	60	110	150	185	210	250	420
ε:	0,975	1,233	1,438	1,438	1,309	1,114	1,002	0,903	0,729	0,686	0,613	0,594	0,559	0,429

Versuch 11. Temperatur 35° C, sonst wie Versuch 10.

Minuten:	5	10	15	20	30	40	60
ε:	1,233	0,975	0,831	0,726	0,643	0,581	0,491

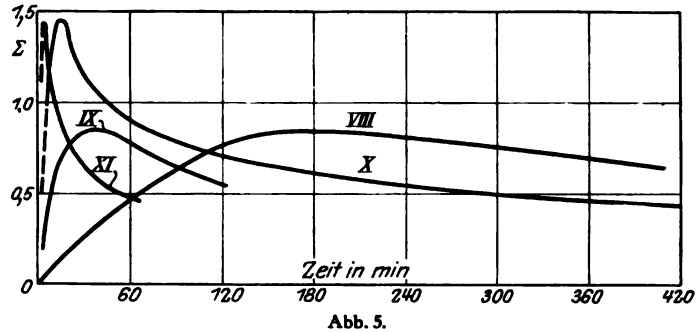


Abb. 5.
VIII. 1,0 Prom. Eisessiglösung Chol. 16,5° C.
IX. 1,0 „ „ „ 35,0° C.
X. 1,0 „ „ Oxychol. 16,5° C.
XI. 1,0 „ „ „ 35,0° C.

Das Oxycholesterin gab also einen schnelleren Verlauf der Reaktion und ein höheres ε max., was wohl auch mit der leichteren Löslichkeit des Oxycholesterins im Reaktionsgemisch im Vergleich mit Cholesterin zusammenhängen dürfte.

Im Versuch 11 ist ε max. schon nach 5 Minuten wahrscheinlich passiert.

Liebermanns Reaktion soll mit Cholesterinester negativ ausfallen (*Lifschütz*, diese Zeitschr. 54, 233, 1913). Beim Versuch, dieses Verhalten zu bestätigen, begegnete mir die überraschende Tatsache, daß die Reaktion immer stark positiv ausfiel, gleichgültig, ob in Ab- oder Anwesenheit von Eisessig.

Eine Verunreinigung meines Präparats mit freiem Cholesterin ist nach dem oben angeführten ausgeschlossen (Kristallform, Schmelzpunkt, keine Fällung mit Digitonin, die quantitative Übereinstimmung mit *Liebermann-Burchards* Reaktion auf freies Cholesterin). Die Cholesterinester waren freilich in Essigsäureanhydrid schwer löslich, aber nach Zusatz der Schwefelsäure trat die Reaktion ein, und die Ester lösten sich nach und nach vollständig; die Reaktionsgeschwindigkeit zeigte sich, wie man erwarten könnte, vom Verteilungszustand der Ester abhängig. Die folgenden drei Versuche dürften dies dartun; sie sind in Abwesenheit von Eisessig ausgeführt.

Versuch 12. 5 ccm einer 1prom. Chloroformlösung von Cholesterinester wurden in einen Kolben abpipettiert und das Chloroform auf dem Wasserbad verjagt. Die zurückgebliebenen Ester waren geschmolzen und in einer sehr dünnen Schicht ausgebreitet. 9,575 ccm Essigsäureanhydrid und 0,074 ccm Schwefelsäure wurden hinzugefügt. Die tausendstel Kubikzentimeter sind geschätzt; die Pipette war in Hundertstel von Kubikzentimetern graduiert. Das Reaktionsgemisch ist mit Rücksicht auf wasserfreies Cholesterin $^1/_{3,25}$prom.; Schwefelsäure war in derselben Konzentration wie früher vorhanden. 15° C.

Minuten:	60	120	180	300
ε:	2,24	1,85	1,45	0,936

Im Gemisch waren keine ungelöste Partikel zu sehen.

Versuch 13. Ein Gemisch von derselben Konzentration wie im Versuch 12 wurde durch direkte Abwägung kristallisierter, in großen Klumpen zusammengebackter Cholesterinester hergestellt. Temperatur 15° C. Die Reaktion trat viel langsamer als im vorigen Versuch ein; noch nach ein paar Stunden schwommen unveränderte Kristalle umher; sie lösten sich nach und nach vollständig. Nach 3 Stunden war $\varepsilon = 1{,}58$; eine Ablesung in Intervallen war aus den oben angeführten Gründen, ohne die Konzentration zu ändern, unmöglich.

Versuch 14. Kristallisiertes, freies Cholesterin wurde abgewogen. Reaktionsmischung dieselbe wie oben, also mit Rücksicht auf wasserfreies Cholesterin $^1/_{3{,}25}$ prom. Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure wie in den Versuchen 12 und 13. Temperatur 15° C.

Minuten:	60	120	180	300
ε:	2,01	1,59	1,25	0,826

Im Versuch 14 war offenbar das Maximum schon nach weniger als 1 Stunde erreicht, und überhaupt verlief die Reaktion etwas schneller als im Versuch 12.

Versuch 15. Temperatur 35°, sonst wie Versuch 14.

Minuten:	5	10	17	25	50
ε:	2,32	1,98	1,51	1,14	0,632

Auffallend sind die hohen ε beim Maximum im Verhältnis zu den niedrigen Werten bei Anwesenheit von Eisessig. Überhaupt sind die Resultate der Versuche 14 und 15 im Vergleich mit denjenigen der Versuche 8 und 9 schwer zu verstehen.

Beim Zusetzen der reinen Schwefelsäure kommt keine beträchtliche Erwärmung zustande, nur etwa 1,5° C, während ungefähr 1 Minute.

Schließlich wurde ein Versuch gemacht zur Kontrolle von *Lifschütz'* Methode zur Bestimmung des freien Cholesterins vermittelst *Liebermanns* Reaktion (diese Zeitschr. 54, 233 uf., 1913).

14,90 mg Cholesterinester wurden auf der Kuhlmannwage abgewogen, mit 10 bis 15 ccm Essigsäureanhydrid während 1 Stunde auf dem Wasserbad unter Rückflußkühler gewärmt, wobei die Ester vollständig in Lösung gingen. Der Kolben wurde über Nacht bei — 5 bis — 10° C gestellt. Dann wurden die wieder ausgeschiedenen Ester in der Kälte abfiltriert, der Kolben und das Filtrum mit eiskaltem Essigsäureanhydrid gewaschen und das Essigsäureanhydrid durch Kochen auf freier Flamme und zuletzt auf dem Wasserbad abgedampft. 16,13 ccm Essigsäureanhydrid und 0,125 ccm Schwefelsäure wurden danach zum Rückstand gesetzt. Nach 5 Minuten bei 35° C war der Extinktionskoeffizient = 0,932, nach 10 Minuten gleichfalls 0,932. Kleine Kugeln von Cholesterinestern schwommen im Reaktionsgemisch umher und lösten sich allmählich. Unter diesen Umständen können quantitative Schlüsse auf die gefundenen Werte nicht gezogen werden, aber so viel steht doch fest, daß auch nach *Lifschütz'* Methode, Kochen mit Essigsäureanhydrid usw., für chemisch reine Cholesterinester eine stark positive Reaktion nach *Liebermann* erhalten wird.

Um die Wellenlängen der Bezirke, innerhalb derer die Bestimmungen ausgeführt wurden, zu messen, wurde die Skala des Spektrophotometers in Natrium-, Lithium- und Rubidiumlicht geeicht. In der Weise wurde eine Kurve erhalten, mittels welcher der Spektralbereich der Ablesung bei Liebermann-(Burchard-)Reaktion zu 605 bis 623 $\mu\mu$, der Bereich der *Lifschütz*schen zu 623 bis 643 $\mu\mu$ bestimmt wurde.

Cholesterinbestimmungen in den Extrakten wurden gemäß den obigen Erwägungen hauptsächlich spektrophotometrisch ausgeführt; für die Bestimmung des freien Cholesterins kam die Digitoninmethode zur Anwendung.

Die untersuchten Chloroformlösungen waren folgende: Von A_I, A_{II} und A_{III} wurden 89 Proz. verseift, das Unverseifbare in Scheidetrichtern extrahiert und zusammen mit B^a_I, B^a_{II} bzw. B^a_{III} (S. 302) in 100 ccm Chloroform gelöst.

Bezeichnungen: $0{,}89\,A_I + B^a_I = C_I$
$0{,}89\,A_{II} + B^a_{II} = C_{II}$
$0{,}89\,A_{III} + B^a_{III} = C_{III}$

Durch die Korrektion aller mit C_I, C_{II}, C_{III} gewonnenen Resultate, mit 100/89 entsteht ein Fehler, der indessen gering wird, erstens weil B^a_I im Verhältnis zum Unverseifbaren von $0{,}89\,A_I$ klein ist, zweitens weil bei den Eiweißbestimmungen etwas Eiweiß verlorengegangen war und also auch die B-Extrakte eigentlich aufwärts korrigiert werden sollten.

Die Plasmaextrakte mußten gesondert behandelt werden, weil P^a_b sogar viel mehr wog als das Unverseifbare von $0{,}78\,P_a$.

Bezeichnungen: Das Unverseifbare von $0{,}78\,P_a$ in 25 ccm Chloroform gelöst $= P_\alpha$, P^a_b in 25 ccm Chloroform gelöst $= P_\beta$.

Alle Korrektionen sind schließlich in den folgenden Faktoren vereinigt:

Faktor für Korrektion von

C_I	bis auf die ganze Fraktion	1,623
C_{II}	„ „ „ „ „	3,813
C_{III}	„ „ „ „ „	3,256
P_α	„ „ 3000 ccm Plasma . . . . $\frac{3000}{78}$	= 38,46
P_β	„ „ 3000 „ „ . . 30 . 1,035	= 31,05

Gemäß den obigen Erwägungen mußte zuerst das Oxycholesterin bestimmt werden.

Tabelle VIII.

Lösung	ccm	Abgelesener Winkel	Extinktionskoeffizient		Oxycholesterin korrigiert m. den Koeffizienten
			pro ccm	im Mittel	g
C_I	0,7	75,8°	1,744	1,747	0,0876
	0,5	68,6	1,751		
	0,4	63,4	1,745		
C_{II}	0,9	62,6	0,749	0,727	0,0856
	0,8	58,7	0,711		
	0,7	56,0	0,721		
C_{III}	0,4	76,9	3,22	3,26	0,328
	0,2	62,1	3,30		
P_α	1,0	0,0	0	0	0
P_β	1,0	73,0	1,068	1,067	0,2556
	0,75	66,5	1,065		

In Summe enthielten die Extrakte der Fraktionen 0,501 g Oxycholesterin, 3000 ccm Plasma nur 0,256 g. Den großen Unterschied dürfte man kaum auf die gut arbeitende Methode (s. Tabelle VIII) zurückführen können; die Ursache läßt sich nicht angeben. Auffallend ist der hohe Oxycholesteringehalt des Albuminextraktes. Es ist weiter recht merkwürdig, daß P_α gar kein Oxycholesterin enthielt, trotz der sehr energischen Extraktion. Cholesterin, Cholesterinester und Phosphatide waren auch nur zum kleinen Teile extrahiert worden.

Bei den *Gesamtcholesterinbestimmungen* wurde für die Berechnung folgende Formel gebraucht:

$$\varepsilon_1 = a \,.\, 1{,}18 + x \,.\, 1{,}652,$$

wo ε_1 = gefundener Extinktionskoeffizient, a = Milligramm Oxycholesterin, x = Milligramm freies und gebundenes Cholesterin, $a + x$ = Gesamtcholesterin.

Tabelle IX.

Lösung	ccm	Abgelesener Winkel	Extinktionskoeffizient pro ccm	Extinktionskoeffizient im Mittel	Gesamtcholesterin korrigiert g
C_I	0,25	72,4°	4,156	4,15	0,433
	0,20	67,3	4,135		
C_{II}	0,40	60,0	1,505	1,52	0,376
	0,30	54,0	1,539		
C_{III}	0,50	78,0	2,728	2,75	0,678
	0,30	67,4	2,769		
P_α	1,0	52,8	0,437	0,435	0,289
	0,75	46,5	0,433		
P_β	0,50	82,1	3,45	3,34	1,64
	0,375	75,6	3,22		

Gesamtcholesterin in allen Fraktionen . . . 1,486 g
„ „ 300 ccm Plasma . . . 1,929 g

Die in den ausgesalzten Fraktionen gefundene Menge macht 77 Proz. von der im Plasma gefundenen aus. Ungefähr 5 Proz. des ausgesalzten Eiweißes waren ja indessen verlorengegangen und damit wahrscheinlich Lipoide.

Der Rest dürfte beim Zusatz von Ammoniumsulfat nicht mit ausgefallen sein.

Es war jetzt möglich, *die Verhältnisse zwischen Gesamtcholesterin und ätherlöslichem Phosphor*, Tabelle VI, zu berechnen. Es ergab sich für

Fibrinogen 20,5
Globulin 16,9
Albumin 9,70

Tatsächlich ist also mit den ersten Fraktionen verhältnismäßig viel Cholesterin, mit der letzten sind verhältnismäßig viel Phosphatide ausgefallen.

Das freie Cholesterin wurde unter Anwendung der Digitoninmethode ermittelt. Ein Teil des Oxycholesterins wird dabei als Digitonid ausgefällt (*Lifschütz* gibt ungefähr 50 Proz. an). So viel erhielt ich zwar in keinem Falle, aber es war doch notwendig, die Menge des Oxycholesterindigitonids zu bestimmen und von der des Cholesterindigitonids zu subtrahieren, um den wirklichen Wert des freien Cholesterins zu erhalten.

Weil P_α wenig Cholesterin enthielt, wurden 10 ccm P_α mit 10 ccm P_α vereinigt und die Menge des freien Cholesterins bestimmt; die Korrektion von P_α mit 100/78, von P_β mit 1,035, kann doch ohne Fehler getrennt ausgeführt werden, da P_α und P_β keine Cholesterinester und P_α kein Oxycholesterin enthielt.

Von den Digitoniden wurde eine gewisse Menge, zwischen 10 und 20 mg, auf der Kuhlmannwage abgewogen, in Eisessig gelöst und auf Oxycholesterin analysiert.

In den Filtraten der Digitoninfällungen, mit Ausnahme der Plasmaextrakte, deren Filtrate sehr wenig Cholesterin enthielten, wurden gleichfalls das Cholesterin und das Oxycholesterin quantitativ ermittelt.

Doppelbestimmungen wurden ausgeführt; die kleine Zahl nach $\pm$ gibt die Differenz der Bestimmungen an.

Tabelle X.

Lösung	ccm	Digitonid g		In der ganzen Fraktion mit Digitonin ausgefälltes Cholesterin und Oxycholesterin g	Davon Oxycholesterin g
C_I	50	0,3641		0,2873	0,0025
C_{II}	50	0,0975		0,1809	0,000 *)
C_{III}	50	0,2050		0,3245	0,0238
$P_\alpha + P_\beta$	10 + 10	0,0899	0,0895	1,776	0,069
	10 + 10	0,0892			

*) Die Bestimmung konnte wegen der geringen Digitonidmenge und der schwachen, obschon deutlich positiven Essig-Schwefelsäurereaktion nicht ausgeführt werden.

Im Filtrat auf die ganze Fraktion berechnetes			Ges.-Cholesterin in Digitoniden + $d:o$ in Filtraten	Gesamtcholesterin nach Tabelle IX
Gesamtcholesterin g	Oxycholesterin g	Gebundenes Cholesterin g	g	g
0,1498 $\pm$ 0,0043	0,0844 $\pm$ 0,0026	0,0654	0,438	0,433
0,1956 $\pm$ 0,0046	0,0629 $\pm$ 0,0016	0,1327	0,377	0,375
0,3655 $\pm$ 0,0013	0,3045 $\pm$ 0,0083	0,0610	0,689	0,678
				Sa.: 1,486
				1,929

Die in zwei verschiedenen Weisen: Direkte Ermittlung der Gesamtcholesterinmenge und Digitoninfällung unter Berücksichtigung der

Filtrate stimmen miteinander gut überein; siehe die beiden letzten senkrechten Reihen.

Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle XI zusammengefaßt.

Tabelle XI.

Präparat	Ätherlöslicher Phosphor g	Ges.-Fettsäuren außer den in Cholesterinestern gebundenen g	Gesamtcholesterin und Oxycholesterin g	Freies Cholesterin g	Als Ester gebundenes Cholesterin g	Oxycholesterin g
Fibrinogen	0,021 12	0,877	0,438*)	0,285	0,0654	0,0876
Globulin .	0,022 20	0,491	0,377*)	0,181	0,1327	0,0629
Albumin .	0,069 9	2,300	0,689*)	0,301	0,0610	0,3275
Summa	0,112 9	3,668	1,504	0,767	0,2591	0,4780
3000 ccm Plasma	0,011 25	4,107	1,963	1,707	—	0,2556

*) Hier als Summe von freiem, gebundenem und Oxycholesterin berechnet.

Die mangelnde Übereinstimmung der Werte des ätherlöslichen Phosphors ist schon oben besprochen.

Von den Fettsäuren sind 89,3 Proz. im ausgesalzten Eiweiß wiedergefunden, vom Gesamtcholesterin 77 Proz.

Das merkwürdige Verhalten, daß in den drei Fraktionen mehr Oxycholesterin gefunden wurde als in 3000 ccm Plasma, kann ich nicht erklären.

Die Ursache des ganzen Mangels der Plasmalipoide an Cholesterinester läßt sich in zwei Richtungen suchen: Erstens wurden vor jeder anderen Behandlung die verwendeten 100 ccm Plasma mit etwas Chloroform als bakterizides Mittel versetzt und in der Kälte während ungefähr einer Woche hingestellt. Da eine geringe Hämolyse kaum zu vermeiden ist, und da die Blutkörperchen, wenigstens nach einigen Autoren, ein cholesterinesterspaltendes Ferment enthalten sollen (14) (15), läßt sich die Möglichkeit einer fermentativen Zerteilung der Ester nicht bestimmt zurückweisen. Für das Plasma, aus dem die Fraktionen ausgesalzt wurden, kommt dies nicht in Betracht, weil es sobald wie möglich nach dem Tode des Pferdes mit Ammoniumsulfat behandelt wurde, zweitens wurde aus dem getrockneten Plasma im Soxhlet nur ein geringer Teil der Lipoide extrahiert; bei dem nachfolgenden, zweistündigen Kochen mit 20proz. Natronlauge kann wohl auch möglicherweise die präformierte, jedenfalls kleine Quantität Cholesterinester verseift worden sein.

Das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem Cholesterin ist ungefähr 3 : 1; gewöhnlicherweise ist es nach mehreren Autoren entgegengesetzt (10) (16). Dieses abweichende Verhalten dürfte mit dem

geringen Gehalt des Plasmas an Cholesterin zusammenhängen; es war an Gesamtcholesterin nur 0,6412 prom.[1]).

Tabelle XII entspricht Tabelle XI, doch sind alle Lipoidquantitäten *in Milligrammen pro Gramm Eiweiß* angegeben.

Tabelle XII.

Präparat	Ätherlöslicher Phosphor mg	Ges.-Fettsäuren außer den in Cholesterinestern gebundenen mg	Gesamtcholesterin mg	Freies Cholesterin mg	Als Ester gebundenes Cholesterin mg	Oxycholesterin mg
Fibrinogen	0,623	25,9	12,9	8,41	1,93	2,58
Globulin .	0,280	6,19	4,75	2,28	1,67	0,79
Albumin .	1,132	37,3	11,2	4,88	0,99	5,31
Plasma . .	—	22,3	10,5	9,27	—	1,39

Zusammenfassung.

1. Bei der Ausfällung der verschiedenen Eiweißkörper des Pferdeplasmas durch fraktionierte Sättigung mit Ammoniumsulfat blieben die Eiweißkörper noch nach der Auflösung durch Dialyse mit Lipoiden stark untermengt. Der weit überwiegende Teil der Lipoide des Plasmas, von den Fettsäuren 89,3 Proz., vom Gesamtcholesterin 77 Proz., wurde mit ausgefällt und ging während der Dialyse wieder in klare Lösung.

2. Das Verhältnis des gesamtcholesterinätherlöslichen Phosphors war für die drei Fraktionen 20,5, 16,9 bzw. 9,70.

3. Im Gegensatz zur Behauptung von *Lifschütz*, daß die Reaktionen von *Liebermann-Burchard* und *Liebermann* für Cholesterin und Oxycholesterin identisch wären, wurde gezeigt, daß die Reaktion mit dem letzteren Stoffe unter allen Umständen viel schneller verlief als mit dem vorigen. Das Maximum der Extinktion schien indessen auf derselben Höhe zu liegen. Zur Ermittlung des Gesamtcholesterins müssen für die beiden Stoffe verschiedene Extinktionskoeffizienten gebraucht werden.

4. *Liebermanns* Reaktion (bei Abwesenheit von Chloroform) wurde gegen *Lifschütz'* Angaben mit reinen Cholesterinestern stets stark positiv gefunden; die Reaktionsgeschwindigkeit war vom Verteilungszustand der Ester abhängig. Die von *Lifschütz* vorgeschlagene Methodik zur Bestimmung des freien Cholesterins mittels dieser Reaktion wurde geprüft, kann aber nicht empfohlen werden.

---

[1]) Möglicherweise ist auch, trotz der Angabe *Thaysens*, bei der gelinden Verseifung mit 5 proz. Kalilauge ein Teil der Cholesterinester verseift worden.

Nach dem Fertigstellen dieser Arbeit im Herbst 1925 ist im *Pflüger*schen Archiv f. d. ges. Phys. des Menschen und der Tiere, Bd. 210, 1/3. Heft, eine Arbeit von *Handovsky*, *Lohmann* und *Bosse* erschienen. Darin wird, gestützt auf experimentelle Untersuchungen, für Rinderseren behauptet, daß ungefähr 25 Proz. vom Cholesterin des Serums an die Globuline fest gebunden seien. Diese Zahl läßt sich mit meinen Resultaten gut vereinigen: etwa 20 Proz. vom Gesamtcholesterin des Plasmas konnte ich im ausgesalzten Globulin wiederfinden. Zwar arbeiten die Forscher mit Serum, ich mit Plasma, aber die Resultate dürften doch in gewissem Maße vergleichbar sein, weil bei der Koagulation das Fibrin cholesterinfrei ausfallen soll (16).

Als sehr zweifelhaft muß wohl doch nach den in dieser Arbeit angeführten Resultaten die Angabe betrachtet werden, daß mit dem Globulin bei Ausfällung mit Ammoniumsulfat keine Phosphatide ausgefällt werden sollten.

Literatur.

1) *I. Bang*, Chemie und Biochemie der Lipoide, S. 25. Wiesbaden 1911. — 2) *Nasse*, Das Blut, Bonn 1836, u. a. siehe *Fåhraeus*. — 3) *Linzenmeier*, Zentralbl. f. Gynäkologie 1920, S. 816; Pflügers Arch. f. Physiol. 1921, S. 272. — 4) *Brinkman-van Dam*, diese Zeitschr. **108**, 1920; *Brinkman-Wastl*, ebendaselbst **124**, 1921. — 5) *Weštergren*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **26**, 631, 1924. — 6) *Kürten*, Pflügers Arch. f. Physiol. **185**, 1920. — 7) *Ley*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **26**, 59, 1922. — 8) *György*, diese Zeitschr. **115**, 71, 1921. — 9) *Hess-Thaysen*, ebendaselbst **62**, 110, 1914. — 10) *Klein-Dinkin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 1914. — 11) *Windaus*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 1909, S. 238; Zeitschr. f. phys. Chem. **65**, 110. — 12) *Lifschütz*, diese Zeitschr. **48**, **54**, **62**, 1913/14. — 13) *Hürthle*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 1895/96. — 14) *Cytronberg*, diese Zeitschr. **45**, 281, 1912. — 15) *Schultz*, ebendaselbst **42**, 255, 1912. — 16) *Wacker-Hueck*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **74**, 416, 1913.

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß vitaminreicher, mineralstoffarmer Ernährung auf den Stoffwechsel und die Lage des Harnquotienten C:N.

Von

Torao Kanamori (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. Juni 1926.)

Die erste Untersuchung über den Einfluß einer salzarmen, aber vitaminreichen Ernährung auf den Stoffwechsel hat *Asada*[1]) im hiesigen Laboratorium auf Veranlassung von Prof. *Bickel* an einem ausgewachsenen Hunde ausgeführt.

Das Ergebnis war folgendes: Das Körpergewicht nahm progressiv ab trotz guter, gleichmäßiger Resorption der kalorisch suffizienten, gemischten Nahrung, die N-Bilanz strebte der Negativität zu, der Grundumsatz (O_2-Verbrauch pro Kilogramm und Minute) verminderte sich etwas. Diese Erscheinungen sind ähnlich denjenigen der Avitaminose. Und doch hatte das Tier, wenigstens in der entscheidenden Versuchsperiode, eine sicher genügende Vitaminmenge mit frischer Butter und frischem Citronensafte erhalten; es hatte auch dauernd genügend Kochsalz bekommen, aber die Nahrung war äußerst arm an Kalk-Magnesium-Kaliumsalzen, speziell an den sogenannten Zellsalzen. Der Versuch erstreckte sich über viele Monate. Der Körper dieses Hundes war bei seinem Tode fast frei von makroskopisch sichtbarem Fett.

In einer zweiten Arbeit aus dem hiesigen Laboratorium über die gleiche Frage hat *Händel*[2]) durch Versuche an Ratten gezeigt, daß weitgehende Ausschaltung der Zellsalze — nicht des Kochsalzes — aus der Nahrung bei offenbar genügender Vitaminzufuhr in den ersten beiden Wochen eine Steigerung des Gaswechsels machte, der dann aber eine progressiv fortschreitende Senkung desselben folgte, und daß diese Umsatzsenkung im allgemeinen beträchtlicher schien, als es der Körpergewichtsverminderung, der diese Tiere ebenso wie der *Asada*sche Hund anheimfielen, entsprach. Ferner beobachtete *Händel*, daß die zellsalzarm aber vitaminreich ernährten Ratten eine leichte Hyperglykämie und Verminderung des Leberglykogens bekamen.

---

[1]) *Asada*, diese Zeitschr. **140**, 1923.

[2]) *Händel*, ebendaselbst **146**, 1924.

Meine eigenen Untersuchungen knüpfen an die im vorstehenden kurz referierten Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium an, deren zusammenfassende Darstellung sich in der Arbeit von Prof. *Bickel*[1]: „Die dynamische Wirkung der Ionen auf Stoffwechsel und Wachstum der organischen Substanz", findet.

Da *Asada* und *Händel* übereinstimmend gefunden hatten, daß der Grundumsatz sich bei zellsalzarm, aber vitaminreich ernährten Tieren (Hund und Ratten) verminderte, war es naheliegend, bei den bekannten Beziehungen, die der Harnquotient C : N zu den Oxydationsprozessen im Körper hat, den Harnquotienten auch einmal bei salzarm, aber vitaminreich ernährten Hunden zu untersuchen. Ich habe meine Tiere also nicht nur zellsalzarm, sondern überhaupt salzarm ernährt. Ferner war es von Interesse, einmal den allgemeinen Stoffwechsel am Hunde bei überhaupt salzarmer, also nicht nur zellsalzarmer Ernährung zu studieren, wenn gleichzeitig genügend Vitaminmengen und überhaupt ein kalorisch suffizientes Futter gegeben wurde, das bei der normalen Salzzulage Körpergewicht- und Stickstoffgleichgewicht garantierte.

Es hatte nämlich *Kauffmann-Cosla*[2]) angegeben, daß beim Hunde, der eine vitaminreiche (Butter- und Citronensaftzulage), kalorisch suffiziente, gemischte Nahrung erhielt, die aber mit Ausnahme von Kochsalz salzarm war, und daß erst recht bei einer Nahrung, die überhaupt salzarm war, also auch Kochsalz in keinen nennenswerten Mengen enthielt, innerhalb von 48 Tagen der Harnquotient C : N von 0,6 auf 1,05 stieg, daß sich die täglichen Harn-C-Mengen von 2 auf 5 g vermehrten, und daß die täglichen Harn-N-Mengen von 2,8 auf 5,36 g allmählich anstiegen. Das Körpergewicht dieses Hundes hatte sich in der genannten Zeit von 6,85 auf 6,65 kg vermindert. Die von *Kauffmann-Cosla* angegebene gewaltige Quotientsteigerung war so auffallend, daß es sich wohl lohnte, gerade diese Untersuchungen an anderen salzarm, aber vitaminreich ernährten Hunden zu wiederholen. Die bei diesem Autor beobachtete Steigerung der N-Ausfuhr und die Abnahme des Körpergewichts stimmten mit den Befunden von *Asada* überein.

Meine eigenen Versuche wurden an zwei erwachsenen Hunden angestellt, die in der unten beschriebenen Weise salzarm, aber vitaminreich ernährt wurden.

Der Hund 1 erhielt als Grundfutter Weizeneiweiß (bezogen von der Chemischen Fabrik Dr. *Klopfer*, Dresden-Leubnitz), Zucker, Reis, frische Butter und frischen Orangensaft. Der Hund 2 erhielt als Grundfutter gemahlenes Pferdefleisch, das durch mehrtägiges Auskochen in destilliertem Wasser unter wiederholter Erneuerung des Wassers soweit salzfrei gemacht

[1]) *Bickel*, Deutsche med. Wochenschr. 1924, Nr. 40 und 43.

[2]) *Kauffmann-Cosla*, C. r. de la Soc. de Biol. de Strassbourg, Séance 15, 1, 1926.

worden war, daß das Kochwasser fast chlorfrei war, außerdem Reis, frische Butter und frischen Citronensaft.

In der Vorperiode bekamen beide Hunde als Zulage zu ihrem Grundfutter Kochsalz und Zellsalzgemisch zu gleichen Teilen. Das Zellsalzgemisch hatte folgende Zusammensetzung: Calc. phosph. 100,0, Magnesium citric. 100,0, Kalium chlorat. 15,0, Ferrum citricum 30,0, Jodi puri 0,05, Kalijodat 0,1 g. In der Hauptperiode bekamen beide Hunde nur das Grundfutter unter Weglassung der gesamten Salzzulage.

Nahrungsmitteltabelle.

Hund 1 (männlich, 9900 g).

Weizeneiweiß	45 g	= 6,165 g N
Zucker	25 g	
Reis	75 g	= 0,9098 g N
Butter	45 g	
Orangensaft	60 ccm	
NaCl	1,5 g	
Zellsalz	1,5 g	
Summe		7,0748 g N

Hund 2 (männlich, 8300 g).

Fleisch	55 g	= 7,7030 g N
Reis	20 g	= 0,2410 g N
Butter	30 g	
Citronensaft	50 ccm	
NaCl	1,2 g	
Zellsalz	1,2 g	
Summe		7,9440 g N

Hund 1 bekam also in der siebentägigen Vorperiode 49,524 g N und die gleiche Menge N in jedem siebentägigen Abschnitt der Hauptperiode. Hund 2 bekam in der zwölftägigen Vorperiode 91,728 g N und in jedem siebentägigen Abschnitt der Hauptperiode 53,508 g N.

Der Kot wurde immer für die ganze Vorperiode und die ganze Hauptperiode gesammelt, getrocknet und gewogen. In Durchschnittsproben der pulverisierten Kotmassen wurden der N- und C-Gehalt bestimmt.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl*, der Kohlenstoff nach der in der Arbeit von *Gomez* angegebenen Methode bestimmt[1]). Alles weitere findet sich in den Tabellen. Es sei noch bemerkt, daß sowohl nach den Erfahrungen am *Asada*schen Hunde wie auch nach den Erfahrungen bei der Ernährung des menschlichen Säuglings eine Citronen- oder Orangensaftmenge von etwa 6 ccm pro Kilogramm Körpergewicht neben einer entsprechenden Butterzulage als genügend angesehen werden kann, um den Vitaminbedarf des Körpers zu decken. Alle Analysen wurden mindestens doppelt ausgeführt, und es wurden nur die Werte übereinstimmender Kontrollanalysen in die Tabellen aufgenommen.

Erster Hund.

Der Harn dieses Hundes zeigte mit der Sulfosalicylsäure und der *Heller*schen Probe anfangs eine Spur Eiweiß, die allerdings sehr geringfügig war; an den betreffenden Tagen findet sich in der Rubrik „Eiweiß im Harn"

[1]) Diese Zeitschr. 167, H. 4/6, 1926.

in den Tabellen das Zeichen +. Manchmal war es überhaupt zweifelhaft, ob Eiweiß vorhanden war; dann steht in der Tabelle „Spur +" oder „fast —". Wenn absolut kein Zweifel bestand, daß der Harn eiweißfrei war, dann steht in der Tabelle das Zeichen —. Da sich in dem Harn des Tieres niemals Nierenelemente nachweisen ließen, darf man wohl annehmen, daß die geringfügigen Eiweißspuren aus den ableitenden Harnwegen stammten. Den Harnquotienten C : N beeinflußten diese Eiweißspuren in keiner nachweisbaren Art.

An einzelnen Tagen fraß der Hund sein Futter nicht quantitativ auf. Das war am 12., 16., 27., 28., 29. April und am 20. Mai der Fall. Diese Tage wurden aus der Tabelle ausgeschaltet, und die Nahrungs- und Kotverluste wurden bei der Berechnung der Bilanz berücksichtigt. In der Periode mangelhafter Nahrungsaufnahme vom 27. bis 29. April hatte sich das Körpergewicht aber nur um 80 g vermindert. Die anderen Tage mit mangelhafter Nahrungsaufnahme hatten überhaupt keine Verminderung des Körpergewichts zur Folge.

Im ganzen nahm der Hund während der salzarmen Periode, also in 55 Tagen, vom 31. März bis 24. Mai 595 g an Körpergewicht ab. Wenn man nun auch den durch Hungern entstandenen Verlust von 80 g davon abzieht, so bleibt immer noch ein Totalgewichtsverlust von 515 g bestehen. Dieser Gewichtsverlust trat auf, obschon die Nahrung gut resorbiert wurde. Denn der durchschnittliche Kot-N- und Kot-C-Gehalt war in der salzarmen Periode geringer als in der Vorperiode. Die N-Bilanz, die in der Vorperiode schwach positiv war, wurde in der Hauptperiode vorübergehend schwach negativ, schließlich aber wieder schwach und dann vorübergehend sogar stärker positiv und blieb positiv bis zum Ende des Versuchs.

Den ersten starken Gewichtssturz erfuhr das Tier zu Beginn der salzarmen Periode. Er betrug hier im Wochendurchschnitt 219 g. Ein zweiter erheblicher Gewichtssturz von 235 g erfolgte in der fünften Siebentageperiode der salzarmen Ernährung trotz der hier am stärksten positiven N-Bilanz während des ganzen Versuchs.

Die Harn-N-Ausscheidung nahm in den ersten drei Wochenperioden der salzarmen Ernährung zu, dann fiel sie wieder allmählich auf den Wert der Vorperiode. Parallel mit den Änderungen in der N-Ausscheidung ging die C-Ausscheidung durch den Harn. Die Folge war, daß der Durchschnittsquotient in den verschiedenen Wochenperioden immer den normalen Wert behielt.

Die Harnmenge war nur in der ersten Woche der salzarmen Ernährung merklich erhöht. Sonst war sie immer ziemlich konstant, bis auf die letzte Woche, in der sie etwas abnahm.

Da das Tier täglich das gleiche Wasserquantum (600 ccm) mit der Nahrung bekam, und da die Außentemperaturen während des ganzen Versuchs ungefähr gleich waren, muß man annehmen, daß der Körper des Tieres mit Eintritt der salzarmen Ernährung einen größeren Wasser-

verlust erlitt, der auch die in der ersten Woche dieser Ernährung stattfindende stärkere Gewichtsabnahme erklärt. Bei dem zweiten stärkeren Gewichtssturz in der fünften Woche der salzarmen Ernährungsweise aber war die Harnmenge ganz normal, d. h. fast die gleiche wie in der Vorperiode. Hier braucht der Gewichtssturz, während dem die N-Bilanz sogar einen stark positiven Wert erreicht hatte, nicht auf Wasserverlust zu beruhen, sicher beruht er auch nicht auf Eiweißverlust wegen der positiven N-Bilanz. Hier könnte Fett in größerer Menge eingeschmolzen worden sein, wenn nicht doch letzten Endes einem Wasserverlust die Hauptrolle zukommt.

Faßt man die Störungen zusammen, die das Tier in der Periode mit salzarmer Ernährung bot, so kann man sagen, daß mit der Verarmung der Nahrung an Salzen zunächst der Körper Wasser in stärkerem Maße verliert und dementsprechend eine erheblichere Gewichtseinbuße erleidet, daß dann aber die Körpergewichtsabnahme in verringertem Umfang fortschreitet, wobei vorübergehend bald stärkere, bald weniger starke Gewichtsverluste auftreten, daß ferner diese Körpergewichtsabnahme in den späteren Perioden sogar bei N-Sparung sich vollziehen kann, und daß endlich der Harnquotient C : N dauernd normal bleibt.

Unter dem Einfluß der salzarmen Ernährung werden also die Eiweißbestände des Körpers relativ am wenigstens angegriffen, vor allem leidet wohl die N-freie Substanz, die in größerer Menge eingeschmolzen werden dürfte, wenn darauf die späteren Gewichtsverluste zu beziehen sind.

Man könnte vom methodischen Gesichtspunkt gegen diesen Versuch einwenden, daß der Harn des Tieres nicht absolut frei von Eiweiß an allen Tagen war. Es lehrt aber die Erfahrung an diesem Hunde, daß derartig minimale Eiweißspuren, wie sie im Harn dieses Tieres vorhanden waren, das Ergebnis nicht merkenswert beeinflussen. Denn in ganz eiweißfreien Perioden bewegten sich die C- und N-Werte des Harns genau in den Grenzen, in denen sie sich in Perioden hielten, in denen regelmäßig Eiweißspuren im Harn vorhanden waren. Ferner führe ich für die Beweiskraft dieses Versuchs an, daß das Resultat des Versuchs an dem zweiten Hunde, dessen Harn immer völlig eiweißfrei war, mit demjenigen an diesem ersten Hunde prinzipiell übereinstimmt.

Zweiter Hund.

Der Harn dieses Hundes war dauernd frei von Eiweiß. An einzelnen Tagen fraß der Hund seine Nahrung unvollständig. Das war in der Vorperiode am 25. und 26. März und in der Hauptperiode am 10., 11., 12. April und vom 15. bis 19. April, ferner am 8., am 10. und 18. Mai der Fall. Diese Tage sind in den Tabellen unter Berücksichtigung der dabei entstandenen Verluste ausgelassen worden.

In der Vorperiode hatte die mangelhafte Nahrungsaufnahme am 25. und 26. März keinen Einfluß auf das Körpergewicht. Dagegen war in der Hauptperiode am 13. April infolge der voraufgehenden ungenügenden Ernährung ein Gewichtsverlust von 230 g und am 20. April wegen der ungenügenden Ernährung vom 15. bis 19. April ein Gewichtsverlust von 1200 g eingetreten, der aber an den folgenden Tagen wieder um etwa 200 g eingeholt wurde, so daß man mit einem Dauerverlust von etwa 1000 g rechnen darf. Die verringerte Nahrungsaufnahme am 8., 10. und 18. Mai war aber ohne Einfluß auf das Körpergewicht.

Alles in allem hat der Hund also in der Hauptperiode infolge schlechter Nahrungsaufnahme 1000 + 230 = 1230 g an Körpergewicht verloren.

Der Verlust betrug vom Ende der ersten Siebentageperiode der Hauptperiode, in der das Tier noch gut gefressen hatte, im Durchschnitt der siebentägigen Abschnitte 8086 — 7146 = 940 g.

Er hat also den durch die schlechte Nahrungsaufnahme bedingten Gewichtsverlust zum Teil wieder eingeholt und mindestens 8282 — 7146 = 1136 g — 940 g, d. h. 196 g verloren, ohne daß dafür schlechte Nahrungsaufnahme verantwortlich ist. Das aber ist der Gewichtsverlust, der sich gleich in der ersten Woche der salzfreien Ernährung eingestellt hatte.

Die Nahrung wurde während des ganzen Versuchs ziemlich gut resorbiert. Denn in der Vorperiode betrug der durchschnittliche N-Gehalt des Kotes pro Tag 0,29 g, in der Hauptperiode 0,427 g, der C-Gehalt des Kotes in der Vorperiode pro Tag 1,637 g, in der Hauptperiode 2,192 g. Die N-Bilanz, die in der Vorperiode schwach negativ war, wurde zu Beginn der Hauptperiode leicht positiv, in den Perioden mit stärkerer Störung in der Nahrungsaufnahme stark negativ und dann schwächer negativ und blieb unter Schwankungen bis zum Ende des Versuchs dauernd negativ. Vorübergehend war dann die Negativität so groß wie in der Vorperiode.

Den ersten starken Gewichtssturz, für den mangelhafte Nahrungsaufnahme nicht verantwortlich war, erlitt das Tier in den ersten 7 Tagen der salzarmen Ernährung. Er betrug 196 g. Hier kommt offenbar der Wasserverlust zum Ausdruck.

Ob der Hund später noch wegen der salzarmen Ernährung an Gewicht verloren hat, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, da er, wie ich schon erwähnte, offenbar die durch die mangelhafte Nahrungsaufnahme an einzelnen Tagen bedingte Körpergewichtseinbuße teils wieder eingeholt hat.

Die Harn-N-Ausscheidung sank zu Beginn der Hauptperiode etwas, nahm dann aber zu, um gegen Ende des Versuchs wieder die Werte der Vorperiode zu erreichen. Parallel mit den Änderungen in der N-Ausscheidung ging die C-Ausscheidung durch den Harn. Die Folge war, daß der Durchschnittsquotient C : N in den verschiedenen Wochenperioden immer den normalen Wert behielt. Die Harnmenge war in der Zeit, in der die Nahrungsaufnahme schlecht war, verringert, sonst bot sie nichts Bemerkenswertes.

Im übrigen ist hinsichtlich der theoretischen Deutung der Befunde von diesem Hunde dasselbe zu sagen, was vom ersten Hunde gesagt wurde.

Tabelle I. Hund 1.

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm		Harn-N g		Harn-C g		C : N		Gesamt-C / Gesamt-N	Kot-N pro Periode g	Kot-C pro Periode g	Tägliche N-Bilanz	Eiweiß im Harn	
24. III.	9900		300		4,673		2,772		0,593					+ 0,213	—	Salzreiche Ernährung
25. III.	10100		255		4,480		2,817		0,629					+ 0,213	+	
26. III.	9900		425		5,415		3,420		0,632					+ 0,213	+	
27. III.	9920	9913	970	389	14,449	5,835	8,146	3,441	0,564	0,596	0,590			+ 0,213	+	
28. III.	9800		405		3,119		1,810		0,580					+ 0,213	+	
29. III.	9950		240		4,906		2,916		0,594					+ 0,213	+	
30. III.	9820		130		3,804		2,206		0,580					+ 0,213	+	
Summe	69390		2725		40,846		24,087		4,172			7,184	25,665	+ 1,494		
31. III.	9650		790		10,065		5,794		0,576					+ 0,223	+	Salzarme Ernährung
1. IV.	9750		550		4,466		2,793		0,625					+ 0,223	+	
2. IV.	9620		510		5,381		3,154		0,586					+ 0,223	+	
3. IV.	9800	9694	420	513	5,174	6,441	3,010	3,815	0,582	0,597	0,592			+ 0,223	+	
4. IV.	9620		400		8,176		4,795		0,586					+ 0,223	Spur +	
5. IV.	9620		690		4,579		2,941		0,642					+ 0,223	„ +	
6. IV.	9800		230		7,245		4,218		0,582					+ 0,223	„ +	
Summe	67860		3590		45,086		26,705		4,179			2,877	19,250	+ 1,561		
7. IV.	9720		460		6,440		3,740		0,581					— 0,105	+	
8. IV.	9520		555		4,895		2,865		0,585					— 0,105	+	
9. IV.	9850		390		9,064		5,286		0,583					— 0,105	+	
10. IV.	9650	9644	500	401	6,930	6,769	4,070	4,111	0,587	0,608	0,607			— 0,105	+	
11. IV.	9500		500		7,910		4,968		0,628					— 0,105	+	
13. IV.	9650		130		5,788		3,628		0,627					— 0,105	+	
14. IV.	9620		275		6,353		4,222		0,665					— 0,105	Spur +	
Summe	97510		2810		47,380		28,779		4,256			2,877	19,250	— 0,734		
15. IV.	9500		445		9,345		5,821		0,623					— 0,320	+	
17. IV.	9600		530		11,353		6,683		0,589					— 0,320	+	
18. IV.	9500		630		6,474		4,063		0,628					— 0,320	Spur +	
19. IV.	9500	9503	335	427	3,611	6,984	2,194	4,218	0,608	0,605	0,604			— 0,320	+	
20. IV.	9600		235		3,818		2,261		0,592					— 0,320	„ +	
21. IV.	9400		600		8,568		5,040		0,588					— 0,320	+	
22. IV.	9420		215		5,719		3,464		0,606					— 0,320	+	
Summe	66520		2990		48,888		29,526		4,234			2,877	19,250	— 2,241		

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm		Harn-N g		Harn-C g		C : N		Gesamt-C / Gesamt-N	Kot-N pro Periode g	Kot-C pro Periode g	Tägliche N-Bilanz	Eiweiß im Harn	
23. IV.	9500		330		4,962		3,241		0,653					+ 0,170	+	Salzarme Ernährung
24. IV.	9500		560		6,899		4,147		0,601					+ 0,170	+	
25. IV.	9520		175		1,813		1,113		0,614					+ 0,170	Spur +	
26. IV.	9400	9391	615	417	10,160	6,494	6,175	3,935	0,608	0,610	0,606			+ 0,170	„ +	
30. IV.	9320		230		6,698		4,214		0,629					+ 0,170	fast —	
1. V.	9300		500		8,540		4,821		0,565					+ 0,170	„ —	
2. V.	9200		510		6,383		3,833		0,601					+ 0,170	„ —	
Summe	65740		2920		45,455		27,544		4,271			2,877	19,250	+ 1,192		
3. V.	9320		245		4,047		2,542		0,628					+ 1,497	fast —	
4. V.	9200		360		5,897		3,660		0,621					+ 1,497	—	
5. V.	9150		365		4,906		2,946		0,600					+ 1,497	fast —	
6. V.	9220	9156	350	421	6,027	5,614	3,718	3,359	0,617	0,599	0,598			+ 1,497	—	
7. V.	9050		480		5,067		2,783		0,549					+ 1,497	fast —	
8. V.	9050		480		7,258		4,303		0,593					+ 1,497	Spur +	
9. V.	9100		670		6,097		3,563		0,584					+ 1,497	fast —	
Summe	64090		2950		39,299		23,515		4,192			2,877	19,250	+ 7,348		
10. V.	9200		240		3,743		2,105		0,562					+ 1,021	fast —	
11. V.	9200		180		2,768		1,724		0,623					+ 1,021	—	
12. V.	9220		515		7,498		3,972		0,530					+ 1,021	—	
13. V.	9100	9139	635	406	8,890	5,643	5,211	3,280	0,586	0,587	0,581			+ 1,021	—	
14. V.	9050		320		4,767		3,155		0,662					+ 1,021	—	
15. V.	9200		445		5,545		3,087		0,557					+ 1,021	—	
16. V.	9000		505		6,292		3,709		0,589					+ 1,021	—	
Summe	63970		2840		39,503		22,936		4,109			2,877	19,250	+ 7,144		
17. V.	9100		290		5,481		3,215		0,587					+ 0,789	—	
18. V.	9120		380		6,458		3,795		0,588					+ 0,789	—	
19. V.	9100		170		5,507		3,347		0,608					+ 0,789	—	
21. V.	9070	9099	200	311	4,435	5,814	2,778	3,529	0,626	0,602	0,601			+ 0,789	—	
22. V.	9100		430		4,960		3,065		0,612					+ 0,789	Spur +	
23. V.	9100		420		8,256		4,901		0,594					+ 0,789	—	
24. V.	9100		290		6,024		3,605		0,598					+ 0,789	—	
Summe	63690		2180		41,121		24,706		4,213			2,877	19,250	+ 5,526		
Gesamt-N und -C und C : N in Hauptperiode			Durchschnitt		306,732		183,738				0,599					

Tabelle II. Hund II.

Datum	Körpergewicht g			Harnmenge ccm		Harn-N g		Harn-C g		C : N		Gesamt-C / Gesamt-N	Kot-N pro Periode g	Kot-C pro Periode g	Tägliche N-Bilanz	
15. III.	8700			300		6,947		4,784		0,689					— 0,416	
16. III.	8600			475		12,302		8,009		0,651					— 0,416	
17. III.	8650			605		8,123		5,184		0,638					— 0,416	
19. III.	8300			465		6,770		4,703		0,695					— 0,416	
20. III.	8450			260		3,800		2,625		0,691					— 0,416	
21. III.	8300			465		7,747		5,422		0,700					— 0,416	
22. III.	8200		8374	500	453	8,008	7,770	5,528	5,200	0,690	0,672	0,669			— 0,416	Salzreiche Ernährung
23. III.	8100	8282		420		9,079		6,167		0,679					— 0,416	
24. III.	8200			430		10,595		7,003		0,661					— 0,416	
27. III.	8420			690		7,825		5,026		0,642					— 0,416	
29. III.	8350			400		5,544		3,718		0,671					— 0,416	
30. III.	8220			430		6,502		4,230		0,651					— 0,416	
Summe	100490			5440		93,242		62,399		8,058			3,480	19,644	— 4,994	
31. III.	8500			300		1,680		1,157		0,689					+ 0,104	
1. IV.	8200			530		9,349		5,842		0,625					+ 0,104	
2. IV.	8250			440		2,427		1,529		0,630					+ 0,104	
3. IV.	8350	8086		550	438	8,855	7,113	5,841	4,591	0,660	0,649	0,645			+ 0,104	
4. IV.	8000			410		9,815		6,376		0,650					+ 0,104	
5. IV.	7950			415		9,552		6,052		0,634					+ 0,104	
6. IV.	7350			420		8,114		5,337		0,658					+ 0,104	
Summe	56600			3065		49,792		32,134		4,546			2,989	15,344	+ 0,727	Salzarme Ernährung
7. IV.	7850			195		8,026		5,286		0,659					— 2,121	
8. IV.	7900			495		10,118		6,620		0,654					— 2,121	
9. IV.	7850			270		7,976		5,207		0,653					— 2,121	
13. IV.	7620	7663		320	288	12,678	9,338	8,586	6,160	0,677	0,659	0,660			— 2,121	
14. IV.	8250			215		8,308		5,470		0,658					— 2,121	
20. IV.	7050			200		7,896		5,228		0,662					— 2,121	
21. IV.	7120			320		10,367		6,721		0,648					— 2,121	
Summe	53640			2015		65,369		43,118		4,611			2,989	15,344	— 14,850	

Tabelle II (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm		Harn-N g		Harn-C g		C : N		Gesamt-C / Gesamt-N	Kot-N pro Periode g	Kot-C pro Periode g	Tägliche N-Bilanz	
22. IV.	7120		310		8,984		5,950		0,662					— 1,186	Salzarme Ernährung
23. IV.	7220		290		6,228		4,005		0,643					— 1,186	
24. IV.	7250		625		7,963		5,819		0,731					— 1,186	
25. IV.	7200	7216	570	442	5,985	8,403	4,191	5,742	0,700	0,684	0,683			— 1,186	
26. IV.	7420		400		7,280		5,134		0,705					— 1,186	
27. IV.	7200		540		13,608		9,150		0,672					— 1,186	
28. IV.	7100		360		8,770		5,947		0,678					— 1,186	
Summe	50510		3095		58,818		40,196		4,791			2,989	15,344	— 8,299	
29. IV.	7200		310		6,569		4,647		0,707					— 0,166	
30. IV.	7130		340		9,520		6,253		0,657					— 0,166	
1. V.	7220		440		5,975		4,116		0,689					— 0,166	
2. V.	7120	7167	565	375	8,464	7,383	5,464	4,926	0,646	0,669	0,667			— 0,166	
3. V.	7200		410		8,840		5,930		0,671					— 0,166	
4. V.	7100		120		3,175		2,105		0,663					— 0,166	
5. V.	7200		440		9,141		5,970		0,653					— 0,166	
Summe	50170		2625		51,684		34,485		4,686			2,989	15,344	— 1,165	
6. V.	7100		485		12,494		8,010		0,641					— 1,211	
7. V.	7150		385		5,519		3,475		0,630					— 1,211	
9. V.	7200		480		4,166		2,888		0,694					— 1,211	
11. V.	7200	7186	180	437	4,309	8,428	2,874	5,476	0,667	0,653	0,650			— 1,211	
12. V.	7300		290		6,512		4,170		0,640					— 1,211	
13. V.	7250		760		12,555		8,044		0,641					— 1,211	
14. V.	7100		480		13,440		8,869		0,660					— 1,211	
Summe	50300		3060		58,995		38,330		4,573			2,989	15,344	— 8,476	
15. V.	7250		330		4,315		2,680		0,621					— 0,755	
16. V.	7300		315		5,354		3,500		0,654					— 0,755	
17. V.	7000		420		8,902		5,809		0,653					— 0,755	
19. V.	7120	7146	420	416	7,903	7,972	5,041	5,125	0,638	0,643	0,643			— 0,755	
20. V.	7200		305		5,167		3,419		0,662					— 0,755	
21. V.	7100		500		9,688		6,136		0,633					— 0,755	
24. V.	7050		625		14,473		9,289		0,642					— 0,755	
Summe	50020		2915		55,802		35,874		4,503			2,989	15,344	— 5,283	
Ges.-N u. -C u. Durchschn. C : N in Hauptper.					340,460		224,137				0,658				

Die Versuche an diesen beiden erwachsenen Hunden lehren folgendes:

1. Mit dem Eintritt der salzarmen Ernährung stellt sich ein starker Körpergewichtsverlust ein, später sinkt das Körpergewicht mit Schwankungen, aber im allgemeinen in geringerem Grade weiter.

2. Die Nahrungsresorption verläuft im allgemeinen während der salzarmen Ernährung in ungestörter Weise.

3. Vorübergehend treten Störungen in der Nahrungsaufnahme auf, die ausnahmsweise auch mit leichter Diarrhöe verbunden sein können.

4. Die N-Bilanz zeigt kein regelmäßiges Verhalten, zeitweise ist sie bei der salzarmen Ernährung negativ, zeitweise positiv.

5. Mit der N-Ausscheidung verläuft die C-Ausscheidung durch den Harn gleichmäßig, so daß der Harnquotient C : N dauernd seinen normalen Wert behält. Auch stärkere tägliche Schwankungen sind bei dem Quotienten während der salzarmen Ernährung nicht zu beobachten.

Meine Beobachtungen an den zwei überhaupt salzarm ernährten Hunden können nicht ohne weiteres mit den Versuchen von *Asada* und *Händel*, die ich in der Einleitung erwähnte, in Beziehung gesetzt werden, weil diese Autoren ihre Tiere mit Kochsalz fütterten, also nur einen Teil der Salze aus der Nahrung entfernt hatten. Es ist wohl denkbar, daß bei qualitativ partiellem Salzmangel die Erscheinungen etwas anders sind als bei dem Mangel an allen Salzen. So könnten z. B. auch Gaswechselstörungen bei qualitativ partiellem Salzmangel auftreten, die bei totalem Salzmangel vermißt werden. Das könnte mit den antagonischen Wirkungen der verschiedenen Ionen auf den Stoffwechsel zusammenhängen.

Gerade Gaswechselstörungen — Herabsetzung oder Herabsetzung nach vorübergehender Steigerung des Gaswechsels — waren von *Asada* wie auch von *Händel* bei ihren Versuchen beobachtet worden. Ich habe bei meinen Hunden den Gaswechsel nicht untersucht, wohl aber die Untersuchung des Harnquotienten C : N vorgenommen. Dieser Quotient blieb dauernd normal. Die N- und C-Ausscheidung durch den Harn war in den absoluten Werten während der Versuche bald etwas erhöht, bald bewegte sie sich in der Höhe der Normalwerte in den Vorperioden oder war leicht erniedrigt. Es sind also doch wohl während der salzfreien Ernährung auch bei meinen Hunden Änderungen in der Oxydation aufgetreten, aber diese Änderungen betrafen immer alle Quoten der C-haltigen Substanz des Körpers offenbar gleichmäßig, so daß eben am Harnquotienten sich nichts änderte. Gerade die Schwankungen in der N-Bilanz können bei der dauernd gleichmäßigen Ernährung und der gleichmäßigen Nahrungsresorption in den Haupt-

perioden nur durch Änderungen in der Oxydation der N-haltigen Substanz zustande gekommen sein. Es sind also auch bei meinen Hunden Schwankungen in der Oxydation aufgetreten, die durch den Salzmangel bedingt sein müssen, aber diese Oxydationsschwankungen haben zu keiner Harnquotientveränderung geführt.

Zum Schluß will ich noch darauf hinweisen, daß alle in dieser Arbeit erwähnten Versuche am Hunde bei ausgewachsenen Tieren angestellt wurden. Diese Tiere scheinen mit einem Minimum an Mineralstoffen in der Nahrung und dann durch entsprechende Mobilisierung von Mineralien aus den Depots im Körper längere Zeit auszukommen, und damit den Stoffwechsel leidlich lange Zeit aufrechtzuerhalten. Eine andere Frage ist, ob der jugendliche Organismus bei seinem starken Wachstum das vermag. Es müßten also derartige Versuche an jungen, heranwachsenden Tieren wiederholt werden. Einschränkend dazu ist allerdings zu sagen, daß *Tsukamoto*[1]) bei jungen Ratten keine Störung des Wachstums bei salzarmer Ernährung gesehen hatte. Indessen könnten bei solchen kleinen Tieren mit großer Gefräßigkeit die Mineralspuren, die sich in einer salzarmen aber vitaminreichen Nahrung immer noch finden, genügen, um die normale Funktion aufrechtzuerhalten. Beim höheren Tiere von größeren Körperdimensionen könnte das alles natürlich anders sein. Die ideale Versuchsanordnung, Fütterung mit chemisch reiner Nahrung und chemisch reinen Vitaminsubstanzen ohne Beimischung von Mineralstoffen, läßt sich leider heute noch nicht durchführen.

---

[1]) *Tsukamoto*. diese Zeitschr. **151**, 1924.

Notiz über das Verhalten des Harnquotienten C:N bei der Phenylhydrazinanämie.

Von

Torao Kanamori (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 12. Juni 1926.)

Im folgenden will ich einen Versuch am Hunde über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei der Phenylhydrazinanämie mitteilen. Das Thema wird durch diesen einen Versuch natürlich nicht erschöpfend behandelt, aber meine Abreise aus Europa hindert mich, die Arbeit zu Ende zu führen. Die technische Schwierigkeit bei der Durchführung derartiger Versuche liegt darin, daß durch die Phenylhydrazinvergiftung bei den Hunden mitunter Diarrhöe oder Albuminurie auftritt, so daß der Versuch vorzeitig abgebrochen werden muß, oder man nicht zu den Graden der Vergiftung kommen kann, die für eine klare Entscheidung des Problems wünschenswert sind. Unter mehreren, aus diesen Gründen vergeblich begonnenen Versuchen ist aber der vorliegende Versuch wenigstens so weit gediehen, daß man daraus ersehen kann, in welcher Richtung die Antwort auf die Frage zu suchen ist, wie durch die Phenylhydrazinanämie der Harnquotient C : N beeinflußt wird.

Bei durch Phenylhydrazin- oder Pyridininjektionen hervorgerufenen toxischen Anämien fand *Eberstadt*[1]) am Kaninchen ein deutliches Absinken der Verbrennungen bis maximal 40 Proz. pro Quadratmeter. Dabei bestand in der Regel ein deutlicher Parallelismus zwischen der Schwere der Anämie, der Geringgradigkeit der Regenerationszeichen am Knochenmark einerseits und der Höhe des Sauerstoffverbrauchs andererseits. Je schwerer also die Anämie war, um so geringer war die Intensität der Verbrennungen. Da bei schweren Aderlaßanämien, die zu einer Erschöpfung des Knochenmarks geführt hatten, das gleiche beobachtet wurde, muß man wohl bei

[1]) *Eberstadt*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **71**, 329, 1913.

den genannten toxischen Anämien die Herabsetzung der Oxydationen auf die Anämie und nicht auf die primäre Wirkung eines toxischen Faktors beziehen [*Grafe*[1])].

Bei schweren Anämien ist sicher die Sauerstoffzufuhr zum Gewebe behindert. Im Harn von Anämikern sind vielfach Produkte mangelhafter Oxydation angetroffen worden. *Collazo*[2]) hatte bei schweren menschlichen Anämien wie bei Phenylhydrazinanämien am Tier die Blutmilchsäure vermehrt gefunden. Alle diese Beobachtungen, auf die auch schon *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*[3]) in ihrer Arbeit zur pathologischen Physiologie und Klinik der dysoxydativen Carbonurie Bezug genommen haben, zeigen, daß es bei den schweren Anämien und insonderheit auch bei der Phenylhydrazinanämie zu der Produktion einer abnormen Menge mangelhaft oxydierter Stoffwechselprodukte kommt. Diese Beobachtungen aber stehen in gutem Einklang mit der Verminderung des Gaswechsels bei der Phenylhydrazinanämie, über die *Eberstadt* (l. c.) berichtete. Die Oxydation ist bei der Anämie nicht nur quantitativ herabgesetzt, d. h. es wird nicht nur weniger Material oxydiert, sondern das der Oxydation anheimfallende Material wird auch in einer qualitativ schlechteren Weise durchoxydiert, als es in der Norm geschieht; darum ist der Abfall an mangelhaft oxydierten Stoffen bei den oxydativen Umsetzungen abnorm erhöht.

So war es wohl möglich, daß sich diese Oxydationsstörung auch am Harnquotienten C : N ausdrücken konnte. In welchem Umfange das der Fall sein würde, konnte nur durch den Versuch entschieden werden.

Der Versuch, über den ich im folgenden berichten will, war so angeordnet, daß ein Hund von etwa 15 kg Körpergewicht täglich mit 500 g frischem Pferdefleisch, 50 g Reis und 2 g Kochsalz ernährt wurde. In einer neuntägigen Vorperiode wurden durch tägliche Untersuchungen die Mittelzahlen für den täglichen Harn-N- und -C-Gehalt, den Harnquotienten C : N, den Hb-Gehalt des Blutes und die Zahl der roten und weißen Blutkörperchen bestimmt. In einer nunmehr folgenden siebentägigen Phenylhydrazinperiode erhielt das Tier bei immer der gleichen Nahrung täglich eine subkutane Injektion von 1 ccm einer Phenylhydrazinlösung in Öl (1,2 g Phenylhydrazin in 12 ccm Olivenöl).

Dann wurden 7 Tage lang die Phenylhydrazininjektionen ausgesetzt, weil der Kot des Tieres zu breiig geworden war. In einer darauf folgenden elftägigen Periode erhielt dann das Tier alle 2 Tage wieder eine Phenylhydrazininjektion von der gleichen Dosis wie früher. Die Harn- und Blutuntersuchungen wurden in allen Perioden täglich gemacht, wie in der ersten Periode. Die Fütterung war immer die gleiche. Nur an den drei letzten Tagen der ersten Phenylhydrazinperiode und an den drei ersten Tagen der darauf folgenden Periode ohne Phenylhydrazingabe konnten die Harnanalysen nicht gemacht werden, weil wegen der leicht diarrhöischen Be-

---

[1]) *Grafe*, Die pathol. Phys. des Ges. Stoff- und Kraftwechsels, Verlag Bergmann, 1923.

[2]) *Collazo*, Zur Pathogenese der dysoxydativen Carbonurie. Deutsch. med. Wochenschr. M. 89, 1925.

[3]) *A. Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, Virchows Arch. 259, 1926.

schaffenheit des Kotes sich dieser etwas dem Harn beigemischt hatte. Der Harn war dauernd frei von Eiweiß, Zucker, Aceton und Acetessigsäure.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl*, der Kohlenstoff nach der in der Arbeit von *Gomez*[1]) beschriebenen Methode bestimmt.

Aus der folgenden Übersichtstabelle ergibt sich, daß die erzeugte Anämie nur von einem leichten Grade war. Die Zahl der roten Blutkörperchen hatte nur um etwa eine Million abgenommen, der Hb-Gehalt hatte sich allerdings um 18 Proz. schließlich vermindert. In der Zwischenperiode, in der die Penylhydrazininjektionen ausgesetzt werden mußten wegen der toxischen Darmerscheinungen, hatte sich die Anämie eher noch etwas weiter verschlechtert. Die N- und C-Ausscheidung durch den Harn nahmen beide etwas zu in den anämischen Perioden gegenüber der Vorperiode, aber bei dem Quotienten C : N war eine aufsteigende Tendenz höchstens schwach angedeutet. Die Differenzen in den absoluten Werten sind zu geringfügig, als daß man aus ihnen irgendwelche Schlüsse ziehen könnte.

Tabelle I.

Anämischer Hund (Phenylhydrazin). *Übersichtstabelle.*

	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N-Harn g	C-Harn g	C : N	Hb Proz.	R. Bl. K.	W. Bl. K.
V	14 746	727	10,876	7,163	0,655	70,8	4 876 666	13 220
P_1	15 079	798	10,787	7,987	0,664	54,1	3 888 571	23 433
Z	14 653	600	11,679	7,819	0,670	54,7	3 400 714	13 674
P_2	15 806	708	11,744	7,931	0,675	52,0	3 760 862	20 450

V = Vorperiode, 24. I. bis 1. II. für 8 Tage. P_1 = 1. Phenylhydrazinperiode, 2. II. bis 8. II. für 7 Tage, aber N, C bzw. C : N sind nur für 4 Tage geprüft, weil der Hund in den letzten 3 Tagen Diarrhöe hatte. Z = Zwischenperiode, 9. II. bis 15. II. für 7 Tage, aber N, C bzw. C : N sind nur 4 Tage geprüft, weil der Hund in den ersten 4 Tagen Diarrhöe hatte. P_2 = 2. Phenylhydrazinperiode, 16. II. bis 26. II. für 11 Tage. Hb = Hämoglobin. R. Bl. K. = Rote Blutkörperchen. W. Bl. K. = Weiße Blutkörperchen.

Wie ich schon in der Einleitung sagte, scheiterte die endgültige Durchführung dieser Versuche mit Phenylhydrazinvergiftung an dem Auftreten toxischer Begleiterscheinungen (Diarrhöe und Vermischung des Harns mit Kot); so konnte die Anämie nicht bis zu den äußersten Graden getrieben werden, die wohl nötig sind, um große, beweisende Ausschläge in der Quotientgestaltung zu erhalten. Bei den leichten Anämien, wie sie in dem vorliegenden Versuch und in anderen Versuchen entsprechender Art, die ich aber hier nicht detailliert wiedergeben möchte, weil sie aus den genannten Gründen noch weniger vollständig wie der vorliegende Versuch durchgeführt werden konnten, ändert sich der Quotient C : N nicht.

[1]) *Gomez*, diese Zeitschr. **167**, 1926.

Tabelle II. Anämischer Hund (Phenylhydrazin).

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm		N-Harn g		C-Harn g		C : N		Hb Proz.		R. Bl. K.		W. Bl. K.		Bemerkungen
24. I.	14 350	14 746	640	727	10,662	10,876	6,920	7,163	0,649	0,658 [0,655]*)	69	70,8	4 965 000	4 876 666	14 800	13 220	*Futter:* 50 g Reis (181 Cal.), 1 Pfd. frisches Pferdefleisch (600 Cal.), 2 g Kochsalz
25. I.	14 700		665		8,845		5,561		0,629		69		4 035 000		14 760		
26. I.	14 650		710		10,536		6,924		0,657		71		4 295 000		12 400		
27. I.	14 920		920		13,395		9,073		0,677		71		4 225 000		13 030		
28. I.	14 800		650		10,372		7,176		0,692		72		5 150 000		13 930		
29. I.	14 850		1080		14,062		8,990		0,639		73		5 815 000		10 930		
30. I.	14 800		790		12,055		8,153		0,676		70		3 945 000		15 930		
31. I.			590		7,268		4,744		0,653		69		5 370 000		12 700		
1. II.	14 900		500		10,690		6,902		0,646		73		6 090 000		10 500		
Summe	117 970		6545		97,885		64,443		5,918		637		43 890 000		118 980		
2. II.	15 100	15 079	975	798	12,831	10,787	8,769	7,987	0,683	0,662 (0,664)	70	54,1	5 035 000	3 888 571	10 200	23 433	Inj. **) 1 ccm
3. II.	14 800		585		8,845		5,799		0,656		67		4 645 000		14 730		
4. II.	14 850		840		13,641		9,035		0,662		59		4 740 000		26 760		
5. II.	15 150		790		12,830		8,316		0,648		54		4 340 000		21 720		
6. II.	15 200										48		3 985 000		26 230		
7. II.	15 200										43		2 165 000		30 860		
8. II.	15 250										38		2 310 000		33 533		
Summe	105 550		3190		48,147		31,949		2,649		379		27 220 000		164 033		

*) In [ ] Durchschnittswert von $\frac{\text{Gesamt-C}}{\text{Gesamt-N}}$.

**) Phenylhydrazin 1,2 ccm zu 12 ccm Olivenöl, davon 1 ccm subkutan injiziert.

Tabelle II (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm		N-Harn g		C-Harn g		C : N		Hb Proz.		R. Bl. K.		W. Bl. K.		Bemerkungen
9. II.	14 720										42		2 725 000		25 433		
10. II.	14 500										43		2 920 000		14 750		
11. II.	14 100	14 653									52		2 715 000		19 000		
12. II.	14 300		590		12,720		8,657		0,681		55	54,7	3 555 000	3 400 714	13 766	13 674	Ohne Injektion
13. II.			500	600	11,970	11,679	8,389	7,819	0,701	0,669 (0,670)	60		3 850 000		10 500		
14. II.	15 200		400		8,904		5,830		0,655		62		3 245 000		5 766		
15. II.	15 100		910		13,122		8,398		0,640		69		4 795 000		6 500		
Summe	87 920		2400		46,716		31,274		2,677		383		23 805 000		95 715		
16. II.	15 300		755		13,006		8,731		0,671		58		4 450 000		7 066		
17. II.	15 600		705		9,870		7,076		0,717		64		3 815 000		12 100		
18. II.	15 600		750		11,340		7,327		0,646		57		4 190 000		14 600		
19. II.	15 500		955		11,230		7,251		0,646		57		4 330 000		14 800		
20. II.	15 600		680		11,043		7,084		0,641		54		4 165 000		15 600		
21. II.	15 900	15 806	610	708	11,017	11,744	7,267	7,931	0,660	0,675 (0,675)	55	52,0	4 060 000	3 760 682	13 100	20 450	Inj. *) 1 ccm
22. II.	16 000		840		10,937		8,156		0,746		54		4 467 500		36 350		
23. II.	15 750		540		13,540		9,492		0,701		53		3 295 000		25 833		
24. II.	16 000		420		11,525		7,374		0,640		41		2 990 000		22 433		
25. II.	16 400		765		13,066		8,819		0,675		43		2 980 000		27 833		
26. II.	16 220		770		12,612		8,664		0,687		36		2 625 000		35 233		
Summe	173 870		7790		129,186		87,241		7,430		572		41 367 500		224 948		
27. II.	Harn gemischt mit Kot. Der Hund bekam heftige Entzündung an der Injektionsstelle.																

*) Phenylhydrazin 1 ccm in 10 ccm Olivenöl gelöst, davon 1 ccm subkutan injiziert.

Eine neue Methode der quantitativen Fettbestimmung in der tierischen Substanz und in ganzen Organismen.

Von

N. D. Zelinsky und **Sch. R. Zinzadze.**

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der I. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 12. Juni 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die übliche Methode der quantitativen Fettbestimmung ist die Extraktion mit absolutem Äther im *Soxhlet*schen Apparat.

Bereits 1891 haben *E. Pflüger* (1) und nach ihm auch andere, wie *Dormeier* (2), *E. A. Bogdanow* (3), *Glikin* (4) und *Ryotaro Inaba* (5), bewiesen, daß diese Methode zwei wesentliche Defekte aufweist: 1. Extrahiert Äther selbst bei sehr langer Extraktion (843 Stunden in den Versuchen von *Dormeier*) nicht alles Fett, und 2. werden außer Fett auch andere Substanzen extrahiert.

Die Unzuverlässigkeit der Methode war somit endgültig bewiesen, denn die Fehler reichten mitunter bis zu 50 Proz. und darüber.

So wird es auch begreiflich, daß neue Methoden der Fettbestimmung ausgearbeitet wurden, die auf der Zersetzung der extrahierten Substanz beruhen, wie die von *Dormeier* (2), *M. Schlesinger* (6), *L. Liebermann* und *J. Székeli* (7), *Nerking* (8) u. a. Gleichzeitig wurden auch die Extraktionsmethoden vervollständigt, und zwar von *E. Bogdanow* (3), *Nöel-Paton* (9), *W. Krylow* (10), *O. Frank* (11), *E. Voit* (12), *H. Leo* (13), doppelte Extraktion mit Alkohol und Äther, *G. Rosenfeld*, Extraktion mit Alkohol und Chloroform (14), *Glikin* nur mit Petroläther (4) usw. Die Untersuchungen von *Kumagawa* und *Suto* (15) bewiesen aber die Ungenauigkeit auch dieser Methoden. Ihrerseits haben *Kumagawa* und *Suto* durch Abänderung der Methode von *Liebermann* und *Székeli* ein Verfahren zur Fettbestimmung mittels Zersetzung der Substanz durch 20proz. Natronlauge und darauf folgende Isolierung und Wägung der Fettsäuren ausgearbeitet.

Zur Berechnung der Menge des neutralen Fettes multiplizieren die genannten Forscher das Gewicht der isolierten Fettsäuren mit dem Faktor 1,046. Diesen Faktor berechneten sie unter Zugrundelegung der Annahme, daß das Rinderfett (sie untersuchten das Fett eines lange hungernden Hundes und Pferdes) aus 70 Proz. Öl-, 20 Proz. Palmitin-, 10 Proz. Stearinsäure besteht.

Diese, wenn auch einfache und bequeme Methode kann aber doch nicht als Universalmethode betrachtet werden, und zwar schon darum, weil das

Verhältnis der Fettsäuren nicht in allen Fetten gleich ist, weshalb der Faktor 1,046 nicht für alle Fälle zutreffend ist.

Ohne auf die Einzelheiten der oben angeführten Methoden einzugehen, wollen wir nur bemerken, daß es, ungeachtet der Wichtigkeit der quantitativen Fettbestimmung, bis jetzt keine streng zuverlässige Methode hierfür gibt.

Als Haupthindernis bei der Fettbestimmung ist die Schwierigkeit der Extraktion des Fettes aus dem Fleische zu betrachten, denn die Extraktion ist selbst bei der feinsten Zerkleinerung des Fleisches nicht vollständig. Dieser Umstand gab eben zur Ausarbeitung von Methoden mit vorheriger Zerstörung des Fleisches Veranlassung.

So unterwarf *Dormeier* (2) das Fleisch der Pepsinverdauung; *Nerking* (8) zersetzte das Fleisch mittels 2proz. Salzsäure, während *Liebermann* und *Székeli* (7) dasselbe Ziel mittels konzentrierter Natronlauge erreichten. Aber keine dieser Methoden entsprach den erhofften Erwartungen: Pepsin verdaut nicht alle Eiweißstoffe und nicht mit gleicher Geschwindigkeit; Natronlauge zersetzt das Fett und beeinflußt somit dessen Berechnung, während 2proz. Salzsäure bei 100° die Eiweißstoffe nicht spaltet.

Es lag der Gedanke nahe, die Frage derart zu lösen, daß man die Eiweißstoffe vollständig zersetzt, ohne hierbei die Fette zu berühren.

Beim Studium der Zerfallsprodukte der Proteine kamen *Zelinsky* und *Ssadikow* (16) auf die Hydrolyse der Proteine im Autoklaven bei 180° mittels verdünnter (1- bis 3proz.) Salz- oder Schwefelsäure.

Hydrolysiert man nach dieser Methode Fleisch (oder sogar ein ganzes Tier), so schwimmen die frei gewordenen Fette auf der Oberfläche des entstandenen Proteinkatalysats (es hinterbleibt ein geringer Niederschlag). Dieser Erscheinung wandten wir unsere Aufmerksamkeit zu.

Es sollte zunächst festgestellt werden, ob das Fett und dessen Spaltprodukte bei der Autoklavenhydrolyse irgend eine Veränderung erleiden, und ob unter Anwendung dieser Methode die Ausarbeitung eines Verfahrens zur Bestimmung des Gesamtfettgehalts der tierischen Substanz möglich wäre.

In der vorliegenden Abhandlung seien nun die von uns erzielten Resultate mitgeteilt.

Es war vor allem festzustellen, wie sich gegen Erhitzen im Autoklaven die doppelte Bindung der Ölsäure verhält, die ja einen wesentlichen Bestandteil des tierischen Fettes repräsentiert.

Wir untersuchten in dieser Richtung reine Ölsäure: Siedepunkt 232° bei 15 mm Druck; $D\,^{20}/_{4} = 0{,}8901$.

Zu einer in einem Probierglas befindlichen genauen Einwägung (1 bis 3 g) wurden 25 ccm Salz- oder Schwefelsäure (1-, 2-, 5proz.) zugesetzt. Das Probierglas wurde zugeschmolzen und im Autoklaven auf 180° während 3 bzw. 6 Stunden erhitzt.

Alsdann wurde die Ölsäure in Äther aufgenommen und unter vermindertem Druck in einer CO_2-Atmosphäre getrocknet; ferner wurde in Petroläther gelöst, durch ein aschenfreies Filter filtriert und nach Abtreiben des Äthers die Jod- und Säurezahl ermittelt.

In der Tabelle I sind die gewonnenen Versuchsresultate zusammengefaßt.

Tabelle I.

Ölsäure. Jodzahl = 89,89.

	3 Stdn. im Autoklaven		6 Stdn. im Autoklaven	
1 proz. H_2SO_4	89,92 89,79 89,87	89,86	89,78 89,93 89,91	89,84
2 proz. H_2SO_4	89,91 89,94 89,78	89,88	89,85 89,77 89,79	89,80
5 proz. H_2SO_4	89,86 89,76 89,93	89,85	89,91 89,88 89,87	89,88

Die Anzahl der Kubikzentimeter NaOH (T = 0,0095) zur Neutralisation von 1 g Ölsäure war vor dem Hineinbringen in den Autoklaven = 14,9 ccm.

	3 Stdn. im Autoklaven		6 Stdn. im Autoklaven	
1 proz. H_2SO_4	14,8 14,9 15,0	14,9	14,8 14,8 14,9	14,8
2 proz. H_2SO_4	15,0 14,8 14,9	14,9	14,8 14,9 14,7	14,8
5 proz. H_2SO_4	14,8 15,0 15,0	14,9	14,9 14,7 15,0	14,9

Ganz analoge Resultate erhielten wir auch mit Salzsäurelösungen.

Aus den Versuchen ergibt sich somit, daß die Oleinsäure unter den gegebenen Bedingungen keine Veränderung erleidet, so daß wir nun Versuche mit frischem Rinder- und Schweinefett[1]) ruhig ausführen konnten.

Die Versuchsergebnisse werden durch die Tabellen II und III veranschaulicht.

Die Versuche mit Salzsäure von gleicher Konzentration ergaben genau dieselben Resultate.

[1]) Zur Darstellung der reinen Fette wurde frisches Rinder- bzw. Schweinefett in wasserfreiem Petroläther gelöst, dann wurde durch ein aschenfreies Filter filtriert, der Äther abgetrieben und das reine Fett unter vermindertem Druck in Kohlensäureatmosphäre getrocknet.

Tabelle II. Rinderfett.

	Anzahl der ccm NaOH ($T = 0{,}0095$) alkohol. Lösung zur Neutralis. der freien Fettsäuren in 1 g Fett		Anzahl der ccm NaOH ($T = 0{,}0095$) zur Neutralis. aller Fettsäuren in 1 g Fett		Jodzahl	
Vor der Hydrolyse im Autoklaven.						
	0,1		14,9		37,28	
3 Stunden im Autoklaven.						
1 proz. H_2SO_4	1,4 1,3 1,4	1,4	14,7 15,0 15,0	14,9	37,41 37,19 —	37,30
2,5 proz. H_2SO_4	1,6 1,5 1,5	1,5	14,9 15,0 14,8	14,9	37,11 37,43 37,49	37,31
5 proz. H_2SO_4	1,6 1,5 1,7	1,6	14,7 15,1 15,0	14,9	37,15 37,29 37,34	37,26
6 Stunden im Autoklaven.						
1 proz. H_2SO_4	6,5 6,4 6,5 6,5	6,5	14,9 14,9 15,0 14,9	14,9	37,21 37,34 37,09 —	37,21

Tabelle III. Schweinefett.

	Anzahl der ccm NaOH ($T = 0{,}0092$) alkohol. Lösung zur Neutralis. der freien Fettsäuren in 1 g Fett		Anzahl der ccm NaOH ($T = 0{,}0092$) zur Neutralis. aller Fettsäuren in 1 g Fett		Jodzahl	
Vor der Hydrolyse im Autoklaven.						
	0,1		15,2		47,93	
3 Stunden im Autoklaven.						
1 proz. H_2SO_4	1,8 1,7 1,8 1,8	1,8	15,3 15,3 15,1 15,2	15,2	47,85 47,96 47,86 —	47,89
2,5 proz. H_2SO_4	1,9 2,0 —	1,95	15,5 15,1 —	15,3	47,95 47,71 47,89	47,85
5 proz. H_2SO_4	2,0 2,2	2,1	15,4 15,1	15,2	47,74 47,89	47,82
6 Stunden im Autoklaven.						
1 proz. H_2SO_4	6,0 6,0 5,9 6,0	6,0	15,1 15,6 15,2 15,1	15,25	47,79 47,98 47,81 —	47,86

Diese Versuche führten zu folgenden Schlüssen:

1. Fette werden beim Erwärmen im Autoklaven nur partiell hydrolysiert.

2. Die Konzentration der Säure wirkt innerhalb 1 bis 5 Proz. nur wenig auf die Hydrolyse der Fette.

3. Die Hydrolyse des Fettes hängt von der Dauer des Aufenthalts im Autoklaven ab: bei sechsstündiger Erwärmung wurde dreimal mehr Fett hydrolysiert als bei dreistündiger.

Im großen ganzen wurde unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr als die Hälfte des genommenen Fettes hydrolysiert.

Zur Berechnung der wirklichen Menge des neutralen Fettes entschlossen wir uns, eine Korrektur auf Glycerin einzuführen. Die nach der Autoklavenhydrolyse gewonnenen Fette + Fettsäuren werden gewogen, in Alkohol (oder Äther-Alkohol) gelöst und mit alkoholischem Natron (oder KOH) titriert, und zwar in Gegenwart von 2 bis 3 Tropfen Phenolphthalein. Die verbrauchte Alkalimenge entspricht einer bestimmten Menge frei gewordener Säuren, was einer äquivalenten Glycerinmenge entspricht.

Die Berechnung geschieht nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{l} CH_2—O—CO—R \\ | \\ CH—O—CO—R + 3\,H_2O = \\ | \\ CH_2—O—CO—R \end{array} \qquad \begin{array}{l} HC\,H.OH \\ | \\ C\,H.OH + 3\,R—COOH \\ | \\ HC\,H.OH \end{array}$$

Es ist zuletzt nur der *Glycerinrest* C_3H_5 in Rechnung zu ziehen, dessen Gewicht in Betracht kommt. Somit entsprechen 120 g NaOH 38 g des erwähnten Glycerinrestes, 1 mg Natron entspricht 0,32[1]) (0,316) mg dieses Restes, d. h. die Anzahl der zur Neutralisation verbrauchten Milligramme NaOH muß mit dem Faktor 0,32 multipliziert und zum gefundenen Gewicht (Fett + Fettsäuren) addiert werden.

Wir erhalten somit folgende Abhängigkeit:

(Fettgewicht + Fettsäuren) + (Anzahl Milligramme NaOH × 0,32) = der gesuchten Menge des neutralen Fettes.

Zur Kontrolle der Genauigkeit dieser Berechnungsart wurden folgende Versuche angestellt:

Reines Rinder- bzw. Schweinefett wurden in Röhrchen aus Jenaer Glas gebracht, dann wurden je 25 ccm 2proz. Salzsäure zugesetzt, zugeschmolzen und 3 Stunden im Autoklaven auf 180° erhitzt.

Die gewonnenen Fette + Fettsäuren wurden, wie in den Versuchen mit Oleinsäure, ausgeschieden.

Nach der Wägung wurde, wie angegeben, titriert, wobei sich die Daten in Tabelle IV ergaben.

Nach diesen Versuchen gingen wir zur Ausarbeitung der Bedingungen über, die für die quantitative Ausscheidung des Fettes aus Fleisch nach dessen Autoklavenhydrolyse geeignet wären.

Vor allem sollte festgestellt werden, wie lange die Hydrolyse des Fleisches dauern muß, damit alles Fett sich in der obenschwimmenden

[1]) Für KOH beträgt dieser Faktor = 0,22 (0,225) mg.

Tabelle IV.

Nr.	Fettgewicht vor der Hydrolyse	Fett + Fettsäure nach der Hydrolyse	ccm NaOH ($T = 0{,}0089$) zur Neutralis. der freien Fettsäuren	Korrektur auf den Glycerinrest	Neutrales Fett gefunden g	Anfangsgewicht Proz.
			Rinderfett.			
1	2,6526	2,6312	3,5	0,0099	2,6411	99,59
2	2,6344	2,6206	3,8	0,0108	2,6314	99,88
3	1,8387	1,8209	2,5	0,0071	1,8280	99,42
4	1,3541	1,3393	1,9	0,0054	1,3447	99,30
			Schweinefett.			
1	0,9954	0,9831	0,6	0,0017	0,9848	98,93
2	1,0154	1,0165	1,2	0,0034	1,0199	100,44
3	2,1456	2,1349	3,1	0,0088	2,1437	99,91
4	1,7584	1,7595	2,3	0,0065	1,7660	100,43

Schicht befinde. Zu diesem Behuf wurde mageres Rinder- bzw. Schweinefleisch im Autoklaven bei 180° 1, 2 und 3 Stunden mit 1- und 2proz. Salz- bzw. Schwefelsäure erhitzt. Es stellte sich dabei heraus, daß nach zweistündigem Erwärmen die Bestandteile des Fleisches hydrolysiert werden und ganz in Lösung übergehen, während die Fette an die Oberfläche schwimmen.

Wir führten deshalb die Hydrolyse im Laufe von 2 Stdn. bei 180° aus.

Wie bereits erwähnt, hydrolysieren Salz- und Schwefelsäure das Fleisch in gleicher Weise; im letzteren Falle kann aber in Gegenwart von Knochen Gips gebildet werden, weshalb Salzsäure bei der Hydrolyse vorzuziehen ist.

Beim Erwärmen im Autoklaven sind folgende überaus wichtige Vorsichtsmaßregeln einzuhalten: 1. Einige Glassorten werden unter diesen Bedingungen zerstört, so daß die Säure merklich neutralisiert wird; am wenigsten wird hierbei, wie wir merkten, das dünne Jenaer Glas angegriffen, weshalb wir auch desselben uns bedienten. 2. Die Probiergläschen sind so zuzuschmelzen, daß ein geringer freier Raum zurückbleibt. Das ist besonders bei Massenanalysen von Wichtigkeit, wo die Proben nach der Hydrolyse bis zur Extraktion lange aufzubewahren sind.

Zur Trennung des Fettes von den übrigen Produkten der Hydrolyse ist ein geeignetes Lösungsmittel erforderlich. Die weiteste Verwendung finden bekanntlich Äthyl- und Petroläther.

Bereits *Glikin*, *Liebermann* u. a. bewiesen, daß bei der Extraktion mit Petroläther das Fett am wenigsten verunreinigt wird. *Kumagawa* und *Suto* bestätigten das Gesagte und bewiesen, daß im Petroläther (Fraktion 50 bis 60°) unlöslich sind: Schwefelsäure, Milchsäure, Phenolphthalein, einige in Äther merklich lösliche Pigmente und andere Substanzen. Außerdem ist Petroläther in Wasser praktisch unlöslich.

Mit Rücksicht auf das Gesagte bedienten wir uns bei unseren Versuchen ausschließlich des Petroläthers.

Die Trennung des Fettes samt Fettsäuren vom Hydrolysat kann entweder durch Schütteln oder durch Extraktion geschehen. Nun bildet aber Petroläther mit Wasser eine Emulsion; deshalb ist die Entfettung in einem passenden Extraktor auszuführen.

Wir bedienten uns eines etwas modifizierten Extraktionsapparats von *Maassen* für Flüssigkeiten, und zwar mit zugeschliffenem Kühler und Kolben (Abb. 1).

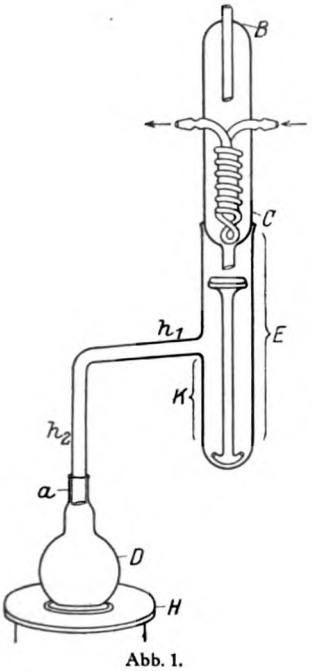


Abb. 1.

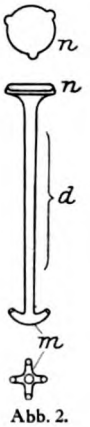


Abb. 2.

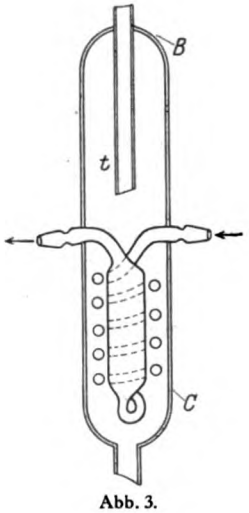


Abb. 3.

Der Apparat besteht aus folgenden Teilen:

1. Der eigentliche Extraktor *E*: Höhe 15 cm, Durchmesser 3 cm; der seitliche Tubus h_1 ist so angeordnet, daß der Teil *K* des Extraktors 100 bis 110 ccm faßt, Tubus h_1 ist 7 cm lang und zwecks leichten Abflusses des Äthers nach unten etwas gebogen. Tubus h_2 ist dem Extraktor *E* parallel. Beide haben einen Durchmesser von 1 cm.

2. Der innere Trichter (Abb. 2) wird in den Extraktor eingestellt. Der aus dem Kühler kommende Äther tropft in den Trichter und fließt durch die unten befindlichen schmalen Öffnungen der Abzweigungen ab (letztere müssen dicht auf dem Boden des Extraktors aufliegen). Die Zahl der Abzweigungen muß 3 oder 4 sein. Der obere Teil des inneren Trichters hat drei Abzweigungen (Äste), die die Wandungen des Extraktors berühren, wie im Apparat von *Maassen*. Dieser Teil des Trichters befindet sich 2 cm unterhalb des Kühlerendes. Durchmesser des Trichterröhrchens 0,5 cm.

3. Der Kühler ist mit zugeschliffenen Enden versehen, und seine Konstruktion ist dem verbesserten Apparat von *Soxhlet* entnommen. Mit Pfeilen ist die Richtung des Kühlwassers in der Kühlschlange angegeben. Das Ende *C* repräsentiert einen Rückflußkühler. Die in ihm kondensierten Ätherdämpfe fließen tropfenweise in den Trichter.

Nach beendeter Extraktion wird der Kühler zwecks Abtreibung des Äthers abgenommen und in den Extraktor mit dem zugeschliffenen Ende *B* eingestellt. Letzteres dient zur Ansammlung. Die Ätherdämpfe kommen hierher durch den Tubus *t* und sammeln sich, kondensiert, rings um den Tubus. Die Länge des Kühlers ist 12 cm, Durchmesser 3 cm.

4. Der zugeschliffene 100 bis 150 ccm fassende Kolben *D* dient als Vorlage.

Der ganze Apparat ist ausschließlich aus Glas und wird in zusammengestellter Form durch Abb. 1 veranschaulicht.

Die Fettextraktion wird in dem Apparat wie folgt ausgeführt: Nach der Hydrolyse wird die Substanz zusammen mit der sauren Flüssigkeit in den Extraktor *E* gebracht (hierbei ist zu beachten, daß das Fett nicht an der Wandung des Extraktors anhaftet). Das Probierglas, in dem die Hydrolyse stattfand, wird einige Male mit *heißem destillierten Wasser* ausgespült (zu je 10 ccm) und am Ende des ersten und zweiten Males mit 20 ccm Petroläther. Die Waschwässer und der Äther werden in den Extraktor gegossen. Das Fett und die Flüssigkeit sollen insgesamt nicht über zwei Drittel des Extraktors *K* einnehmen. Alsdann wird der Extraktor an einem Stativ befestigt, der Trichter eingestellt und darüber der Kühler. Tubus h_2 wird mit dem zugeschliffenen Kölbchen verbunden, in dem sich 60 bis 100 ccm Petroläther befinden. Das Kölbchen wird am Wasserbade (60 bis 70°) erwärmt. Der Apparat wirkt wie folgt: Die Ätherdämpfe gehen aus dem Kölbchen *D* durch den Extraktor in den Kühler, werden kondensiert und fließen in den Trichter *n* und gehen von hier in die Äste *m*, wie im Extraktor von *Maassen*, durch die ganze Flüssigkeitsschicht, sammeln sich darüber und fließen mit Fett beladen in das Kölbchen *D*.

Zahlreiche Versuche lehrten uns, daß bei zweistündiger Extraktion mit Petroläther im beschriebenen Apparat *alles Fett samt Fettsäuren* aus dem Hydrolysat extrahiert werden.

Um uns hiervon zu überzeugen, haben wir, wie üblich, einen Tropfen Petroläther (nach kurzem Auseinandernehmen des Tubus h_2) auf Filterpapier gebracht. Die Extraktion haben wir als beendet betrachtet, wenn auf dem Papier kein Fettfleck zurückblieb. Gewöhnlich trat solch ein Moment zwischen der ersten und zweiten Stunde der Extraktion ein.

Um uns von der Vollständigkeit der Extraktion zu überzeugen, haben wir die im Extraktor zurückgebliebene saure Flüssigkeit durch ein aschenfreies Filter filtriert, den geringen Niederschlag mit 20proz.

Natronlauge gekocht, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und in demselben Apparat 2 Stunden mit Petroläther extrahiert.

Es stellte sich hierbei heraus, daß bei solch einer Behandlung des Niederschlags keine wägbaren Säuremengen in den Äther übergingen.

Hieraus folgt, daß die festen Rückstände des Hydrolysats keine Fette und Fettsäuren enthalten.

Das aus hydrolysiertem Fleisch extrahierte Fett ist etwas braun gefärbt, was auf Verunreinigungen hinweist. Zur Entfernung der letzteren wurde das Fett unter vermindertem Druck in einer CO_2-Atmosphäre gut getrocknet; alsdann wurden 20 bis 30 ccm *wasserfreien* Petroläthers zugesetzt (Fraktion 50 bis 60°) und nach Umschütteln 1 Stunde stehengelassen; hierbei werden die Verunreinigungen als flockiger Niederschlag gefällt; nach Filtration wurde der Äther abgetrieben. Nach solch einer Behandlung erhält man völlig farbloses reines Fett.

Die Methodik der Fettbestimmung besteht im folgenden: 2 bis 5 g Substanz (je nach dem Fettgehalt) werden in ein Probierrohr aus Jenaer Glas gebracht, 25 ccm 2proz. Salzsäure zugesetzt, das Probierrohr wird zugeschmolzen und im Autoklaven 2 Stunden bei 180° erhitzt (etwa 10 Atm. Druck).

Das gewonnene Hydrolysat samt obenschwimmendem Fett und Fettsäuren werden in den Extraktor gebracht und die Fettextraktion, wie oben gesagt, ausgeführt.

Die Zirkulation des Äthers bei der Extraktion wird so reguliert, daß man die aus dem Kühler in den Trichter abfließenden Tropfen zählen kann.

Die Extraktion wird 2 Stunden geführt, was vollauf genug ist, um zu erreichen, daß ein aus dem Tubus *h* abfließender Tropfen einen Fettfleck auf Filterpapier zu geben aufhört. Nach Ende der Extraktion wird der Kühler umgekehrt und der Äther wird ringsum des Röhrchens *t* des Kühlers gesammelt.

Das zurückgebliebene Fett + Fettsäuren werden unter vermindertem Druck in einer CO_2-Atmosphäre getrocknet; alsdann werden 20 bis 30 ccm *wasserfreien* Petroläthers (50 bis 60°) zugesetzt, geschüttelt, mit einem Uhrglas bedeckt und 1 Stunde stehengelassen. Die Lösung wird durch ein aschenfreies, mit Äther gewaschenes Filter filtriert; der Rückstand wird nach Abtreiben des Äthers getrocknet und gewogen, in Alkohol (oder Alkohol-Äther) gelöst und mit alkoholischem Natron in Gegenwart von Phenolphthalein titriert.

Das Gewicht des neutralen Fettes wird nach folgender Formel berechnet:

$$(a + b) + (n \times 0{,}32) = X,$$

wo $a + b$ = Fett + Fettsäuren sind; n = Anzahl Milligramme NaOH zur Neutralisation der frei gewordenen Fettsäuren; 0,32 den dem

Glycerinrest entsprechenden Faktor und X die gesamte Fettmenge bedeutet.

Nach dieser Methode haben wir den Fettgehalt einiger Fleischsorten und ganzer Organismen bestimmt.

Weiße Ratte.

Eine mit Chloroform getötete weiße Ratte wurde im Autoklaven 2 Stunden (in einem Porzellanglas) in Gegenwart von 100 ccm 2proz. Salzsäure hydrolysiert.

Gewicht der Ratte = 79,2547 g.

Gewicht des gewonnenen Fettes + Fettsäuren = 1,9837 g.

Zur Neutralisation der frei gewordenen Fettsäuren wurden 4,4 ccm NaOH (T = 0,0088) verbraucht.

Gesamtfettgewicht = 1,9961 g (1,9837 + 0,0124) = 2,51 Proz.

Alsdann wurden bearbeitet: 1. Eben eine solche Ratte, 2. Rindfleisch, 3. Schweinefleisch u. a.

Um mittlere Proben zu erzielen, wurden sowohl das Tier (ohne Kopf) als auch das Fleisch einige Male durch die Fleischhackmaschine durchgelassen, so daß eine homogene Masse für die Arbeitsproben entstand, welch letztere folgende Versuchsdaten ergaben.

Tabelle V.

Nr.	Fleisch- bzw. Tiergewicht	Fett + Fettsäuren	ccm NaOH zur Neutralis. der freien Fettsäuren	Korrektur auf den Glycerinrest	Gewicht des gefundenen Fettes	Fettgehalt der Probe Proz.	Fett + Fettsäure Proz. N	Fett + Fettsäure Proz. P
			(T = 0,0089). Weiße Ratte.					
1	15,2938	0,5271	0,9	0,0026	0,5297	3,46	—	—
2	5,1399	0,1803	0,3	0,0009	0,1812	3,53	—	—
3	8,9214	0,3075	—	—	—	—	0,03	0,001
			(T = 0,0088). Rindfleisch.					
1	4,9136	0,2245	0,4	0,0011	0,2256	4,59	—	—
2	3,7922	0,1726	0,3	0,0009	0,1735	4,59	—	—
3	5,9006	0,2732	0,5	0,0014	0,2746	4,64	—	—
4	4,1397	0,1829	—	—	—	—	—	—
5	5,3425	0,2497	—	—	—	—	0,02	0,004
			(T = 0,0087). Schweinefleisch.					
1	5,1342	0,1996	0,4	0,0011	0,2007	3,91	—	—
2	3,2118	0,1198	0,3	0,0009	0,1207	3,76	—	—
3	3,9495	0,1497	0,4	0,0011	0,1508	3,80	—	—
4	5,4115	0,2143	—	—	—	—	—	—
5	4,6817	0,1784	—	—	—	—	0,008	0,001
			(T = 0,0080). Kleiner Fisch (Barsch).					
1	21,9377	0,4117	1,2	0,0030	0,4147	1,88	—	—
2	35,1145	0,4938	—	—	—	—	0,01	0,008
			(T = 0,0087) Ochsenhirn.					
1	4,7351	0,1157	0,3	0,00084	0,1165	2,45	—	—
2	5,0125	0,1231	0,4	0,0011	0,1242	2,48	—	—
3	3,5899	0,0868	0,3	0,00084	0,0876	2,42	—	—
4	4,1937	0,1029	0,3	0,00084	0,1037	2,47	—	—

Anmerkung: Auch der Aschengehalt des Fettes + Fettsäuren wurde ermittelt und erwies sich beim Rindfleisch (Versuch 4) = 0 und beim Schweinefleisch (Versuch 4) = 0.

Nach der Hydrolyse der Ratte (ganzes Tier) blieb ein Rückstand hydrolysierter Knochen zurück, der bei der geringsten Berührung in ein Pulver zerfiel.

Wir wollten auch sehen, ob sich nach dieser Methode auch alles Knochenfett bestimmen läßt. Zu diesem Behuf wurden vom Fleisch befreite Rinderknochen im Autoklaven hydrolysiert. Das Fett schwamm nach oben auf, während die Knochen in eine spröde, leicht zerfallende Masse verwandelt wurden. Die Versuchsresultate waren die folgenden:

Nr.	Knochengewicht	Fett + Fettsäuren	ccm NaOH ($T = 0{,}0087$) zur Neutralis. der freien Fettsäuren	Korrektur auf den Glycerinrest	Gewicht des gefundenen Fettes	Fettgehalt der Probe Proz.
			Rinderknochen.			
1	23,5373	0,3047	0,2	0,0006	0,3053	1,29
2	19,3590	0,1921	0,2	0,0006	0,1927	0,99
			Ganzer Schweineknochen.			
1	15,1357	0,2194	0,2	0,0006	0,2200	1,45
2	21,3591	0,2914	0,3	0,0009	0,2923	1,37

Um uns von der Vollständigkeit der Entfettung zu überzeugen, filtrierten wir das im Extraktor zurückgebliebene Hydrolysat durch ein aschenfreies Filter, kochten den geringen Niederschlag mit 20proz. Natronlauge, säuerten mit Salzsäure an und extrahierten 2 Stunden. In keinem einzigen Falle konnte ein wägbarer Fettrückstand erhalten werden.

Somit ist unsere Fettbestimmungsmethode auch bei Knochen anwendbar.

Um uns noch zu überzeugen, daß das extrahierte Knochenfett keine Verunreinigungen in merklicher Menge enthält, haben wir im gewonnenen Fett + Fettsäuren den Gehalt an Asche, N und P bestimmt. Sie erwiesen sich als völlig aschenfrei, während der Gehalt an N- und P-haltigen Substanzen so gering ist, daß er auf die Genauigkeit der Fettbestimmung keinen wesentlichen Einfluß haben kann (vgl. Tabelle V).

Die Asche wurde durch Ausglühen im Platintiegel bestimmt. Eine Einwägung des extrahierten Fettes wurde in reinem entwässerten Petroläther gelöst, die Lösung in den Platintiegel gegossen und der Äther auf dem Wasserbade abgetrieben. Das Fett + Fettsäuren wurden auf einer schwachen Flamme vorsichtig verkohlt. Nach Ausglühen des Tiegels konnte ein wägbarer Rückstand nicht konstatiert werden.

Zur Bestimmung von N und P wurden Fett + Fettsäuren in 100 ccm wasserfreien Petroläthers gelöst und für jede Bestimmung eine halbe Lösung genommen.

N-Bestimmung. 50 ccm der Lösung wurden in ein kleines *Kjeldahl*sches Kölbchen gebracht, der Äther wurde auf dem Wasserbade verdampft und die Probe wie üblich in Gegenwart von $CuSO_4$ verbrannt. Alsdann wurde mit destilliertem (NH_3-freiem) Wasser verdünnt, Soda bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt und in eine Vorlage mit Wasser überdestilliert. Ammoniak wurde kolorimetrisch mittels des *Nessler*schen Reagens bestimmt.

P-Bestimmung. Dieselbe geschah nephelometrisch (kolorimetrisch) nach der Methode von *Pouget* und *Chouchak* (17).

Somit weist unsere Methode folgende Vorzüge auf: 1. Sie nimmt wenig Zeit in Anspruch und ist besonders bei Massenanalysen bequem, da man im Autoklaven mehrere Proben hydrolysieren kann. 2. Man kann die hydrolysierten Proben einige Tage, bis sie an die Reihe kommen, aufbewahren. 3. Die Fettbestimmung geschieht mit gleichem Erfolg sowohl mit frischen als mit getrockneten Proben. 4. Das Gesamtknochenfett läßt sich bestimmen. 5. Nach dieser Methode wird das Fett *in seinem natürlichen*, schwach hydrolysierten Zustand bestimmt.

Die Methode ist für Produkte tierischen Ursprungs ausgearbeitet worden.

Wir denken, daß dieselbe sich auch auf Produkte pflanzlichen Ursprungs wird ausdehnen lassen. Diese Frage muß aber noch eingehend, und zwar in jedem Spezialfall, studiert werden, da in einigen Pflanzenölen Fettsäuren mit besonders beweglichen Doppelbindungen (Leinöl-, Linolensäure u. a.) vorhanden sind.

Aus dem Gesagten erhellt, daß man nach unserer Methode den Gesamtfettgehalt sowohl ganzer Organismen, als auch einzelner Teile des Tierkörpers bestimmen kann. Auf diese Weise können somit die Erscheinungen der Fettdegeneration einer genauen Untersuchung in bezug auf die Änderung des Fettgehalts unterzogen werden.

Anhang.

Tabelle VI.

Tabelle der Korrekturen für den Glycerinrest bei der Titrierung mit NaOH (Anzahl mg NaOH × 0,32).

NaOH mg	Korrektur g	NaOH mg	Korrektur g	NaOH mg	Korrektur g	NaOH mg	Korrektur g	NaOH mg	Korrektur g
1	0,00032	7	0,00224	25	0,0080	55	0,0176	85	0,0272
2	0,00064	8	0,00256	30	0,0096	60	0,0192	90	0,0288
3	0,00096	9	0,00288	35	0,0112	65	0,0208	95	0,0304
4	0,00128	10	0,00320	40	0,0128	70	0,0224	100	0,0320
5	0,00160	15	0,00480	45	0,0144	75	0,0240	200	0,0640
6	0,00192	20	0,00640	50	0,0160	80	0,0256	300	0,0960

Tabelle VII.

Tabelle der Korrekturen für den Glycerinrest bei der Titration mit KOH (Anzahl mg KOH × 0,22).

KOH mg	Korrektur g	KOH mg	Korrektur g	KOH mg	Korrektur g	KOH mg	Korrektur g	KOH mg	Korrektur g
1	0,00022	8	0,00176	35	0,0077	65	0,0143	95	0,0209
2	0,00044	9	0,00198	40	0,0088	70	0,0154	100	0,0220
3	0,00066	10	0,00220	45	0,0099	75	0,0165	200	0,0440
4	0,00088	15	0,00330	50	0,0110	80	0,0176	300	0,0660
5	0,00110	20	0,00440	55	0,0121	85	0,0187	400	0,0880
6	0,00132	25	0,00550	60	0,0132	90	0,0198	500	0,1100
7	0,00154	30	0,00660						

Literatur.

1) *E. Pflüger*, Arch. f. d. Physiol. **51**, 277, 1891. — 2) *C. Dormeier*, ebendaselbst **61**, 341, 1895; **65**, 90, 1897. — 3) *E. A. Bogdanow*, ebendaselbst **68**, 431, 1897. — 4) *W. Glikin*, ebendaselbst **95**, 107, 1903. — 5) *Ryotaro Inaba*, diese Zeitschr. 8, 348, 1908. — 6) *M. Schlesinger*, Diss. Breslau 1900. — 7) *Liebermann* und *Székely*, Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 360, 1898. — 8) *J. Nerking*, ebendaselbst **78**, 172, 1898. — 9) *Nöel-Paton*, Journ. of Physiol. **19**, 37, 1896. — 10) *W. Krylow*, Virchows Arch. **44**, 143, 1868. — 11) *O. Frank*, Zeitschr. f. Biol. **35**, 549, 1897. — 12) *E. Voit*, ebendaselbst **35**, 555, 1897. — 13) *H. Leo*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 73, 1885. — 14) *G. Rosenfeld*, Centralbl. f. inn. Med. **21**, 833, 1900. — 15) *M. Kumagawa* und *K. Suto*, diese Zeitschr. 8, 212, 1908. — 16) *N. D. Zelinsky* und *W. S. Ssadikow*, ebendaselbst **136**, 241; **137**, 397; **138**, 156, 1923. — 17) *Pouget* und *Chouchak*, Bull. Soc. chim. France (4) **5**, 203, 1909; **9**, 649, 1911.

Zur Frage der Milchsäurebestimmung in kleinen Blutmengen, Modifikation der Clausenschen Methode.

Von

Th. Brehme und **B. Brahdy** (New York).

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Während es nun eine ganze Reihe guter und bewährter Mikromethoden für den einen Teil des „Kohlehydratkreislaufs", den Blutzucker, gibt, ist die Zahl der Milchsäuremethoden nur sehr klein.

Sehen wir von den kolorimetrischen Bestimmungen, deren Subjektivität einer weiteren Verbreitung hindernd im Wege steht, ab, so ist die fast von allen Autoren gebrauchte Methode, sofern wir die deutsche Literatur in Betracht ziehen, die direkte Destillation mit Kaliumpermanganat nach *Fürth-Charnaß* in ihren verschiedenen Modifikationen, hauptsächlich der von *Embden* und *Hirsch-Kauffmann*[1]).

Eine Anwendung dieser Methoden in der Pädiatrie, insbesondere zu Reihenuntersuchungen, ist wegen der zu ihrer Ausführung benötigten großen Blutmenge (10 bis 20 ccm) unmöglich[2]). So war es zu begrüßen, daß *Clausen*[3]) eine Mikromethode schuf, die wesentlich kleinere Blutmengen (2 bis 3 ccm) erfordert. Das Prinzip dieser Methode ist, daß der bei 140° in Gegenwart starker Schwefelsäure gebildete Acetaldehyd durch einen Luftstrom in die Vorlage herübergerissen wird, wo er sich an Natriumbisulfit anlagert und dann mit Jodlösung titriert werden kann. Und zwar titriert *Clausen* nicht das restliche Bisulfit, das ja durch die Durchlüftung in stets

---

[1]) Hoppe-Seyler **140**, 1924.

[2]) Anmerkung (nach Fertigstellung der Arbeit): Inzwischen teilt *Warburg* (Klin. Wochenschr. 1926, S. 829) Versuche mit, aus denen hervorgeht, daß er mit der *Charnas-Embden*schen Methode die Milchsäure in 1 ccm Rattenblut, ja in 0,5 ccm Tumorflüssigkeit zu bestimmen in der Lage war. Wir selbst konnten mit dieser Methode bei Verwendung so kleiner Mengen nicht zu dauernd guten Resultaten kommen.

[3]) Journ. of biol. Chem. **52**, 1922.

varianter Weise verbraucht wird, sondern er bestimmt nach Entfernung des überschüssigen Bisulfits durch Jod und Alkalisierung den vorher an den Aldehyd gebunden gewesenen Anteil.

Es ist nicht leicht einzusehen, warum sich die *Clausen*sche Methode so wenig eingeführt hat. Vielleicht liegt es einmal daran, daß sie ein Metallbad erfordert, das vielen Instituten nicht zur Verfügung steht, und daß ferner die Angaben des Autors in der Originalarbeit über Einzelheiten der Apparatur und Technik nur spärliche sind, woraus sich für spätere Untersucher mancherlei Schwierigkeiten ergeben haben mögen. Daher kommt es wohl auch, daß die meisten amerikanischen Autoren, die mit der Methode arbeiten, die verschiedensten Modifikationen angeben und über mannigfache Schwierigkeiten berichten, insbesondere schwankende Werte und schlechte Kontrollbestimmungen.

Auch wir hatten anfangs mit einer ganzen Reihe von Schwierigkeiten zu kämpfen, ehe die Methode zuverlässig für uns wurde. Wenn wir uns heute entschließen, unsere Erfahrungen mitzuteilen, so geschieht das einmal, um auf die ganz ausgezeichnete *Clausen*sche Mikromethode hinzuweisen, und zweitens eine Reihe größerer und kleinerer Modifikationen anzugeben, die für ein gutes und sicheres Arbeiten unerläßlich sind, und die die Methode so weit verbessert haben, daß sich konstante Werte und gute Kontrollen erzielen lassen.

Modifikation der Apparatur.

Aus äußeren Gründen mußten wir von vornherein auf die Anwendung eines Metallbades verzichten. Wir suchten es durch ein Ölbad zu ersetzen, das ja ebenfalls sehr gut Temperaturen von 140° oder höher ermöglicht, waren uns aber darüber klar, daß nunmehr die Durchsaugung der über dem Ölbad befindlichen und mit Öldünsten gesättigten Luft verhindert werden müßte, da sonst ein von der Menge der durchgesaugten Luft abhängiger Leerwert die wahrscheinliche Folge war. In der Tat resultierte auch ein solcher, der zwischen 0,25 bis 0,40 n/200 Jod schwankte, umgerechnet 8 bis 12 mg-Proz. betrug, also ungefähr ebensoviel wie die meisten Milchsäurewerte im Blute. Der Umschlagspunkt der Jodstärkereaktion fiel in diesen Fällen ganz rötlich und unscharf aus. Außerdem erwies es sich, daß ab und zu der das Reaktionsgefäß verschließende Gummistopfen durch Schwefelsäure angegriffen wurde, wodurch die Entstehung neuer bisulfitbindender Substanzen zu erwarten war. Wir beschlossen daher, auf jede Gummiverbindung oder Dichtung durch organisches Material zu verzichten und zweitens die in ihrer Zusammensetzung wohl stets konstante Luft der freien Atmosphäre, also von außerhalb der Laboratoriumsräume, zu benutzen. So konnten wir hoffen, ein sehr geeignetes Mittel für den Transport des im Reaktionsgefäß entstehenden Aldehyds gewählt und allen Schwankungen des Leerwertes vorgebeugt zu haben.

Die aus diesen Voraussetzungen resultierende Modifikation des Destillationsapparats war relativ einfach und wird am besten aus folgender Zeichnung deutlich.

R ist das Reaktionsgefäß aus Jenaer Glas, in das die zu destillierende Flüssigkeit kommt. Der Aufsatz desselben trägt den mit Glashahn verschließbaren Trichter, der die nötige Menge Schwefelsäure aufnimmt. *V* 1 und *V* 2 sind die Vorlagen, die mit Natriumbisulfit beschickt werden. Sie sind untereinander und mit *R* durch fest angeschmolzene Glasröhren

verbunden, die zwischen V 1 und V 2 durch den Trennungsschliff T unterbrochen werden können, so daß der Apparat leichter transportabel wird (auch zwischen R und V 1 ist die Anbringung eines Trennungsschliffes möglich). Die Vorlagen V 1 und V 2 sowie R sind mit den Aufsätzen durch gut sitzende Schliffe verbunden und werden durch je zwei seitliche Federn zusammengehalten. Die Dichtung der Schliffe erfolgt bei V 1 und V 2 mit Hahnfett, während am Reaktionsgefäß solches natürlich nicht und an keinem Teile verwendet werden darf. Hier wird sie dadurch erreicht, daß der obere Rand des Gefäßes falzartig erweitert ist und Schwefelsäure aufnehmen kann, die ganz ausgezeichnet abzudichten in der Lage ist, und deren Eindringen in das Reaktionsgefäß absolut nebensächlich ist, da der Destillations-

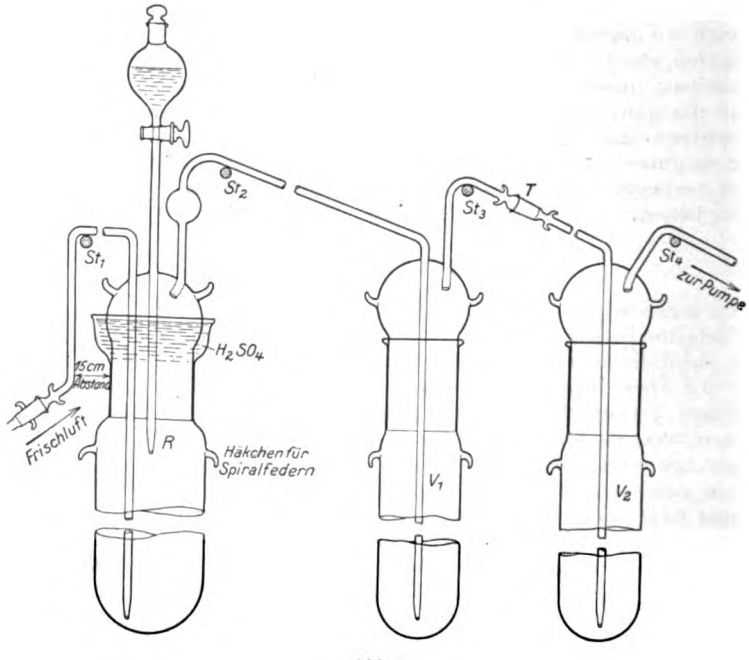


Abb. 1.

prozeß sowieso in Gegenwart von Schwefelsäure vor sich geht. Das Reaktionsgefäß steht in dem aus starkem Kupferblech gefertigten Ölbad, welches Leinöl oder das übliche Öl für Ölbäder enthält. Die erste Vorlage (V 1) taucht in ein Wasserbad, worin sie durch kaltes Wasser genügend gekühlt wird. Es empfiehlt sich, den Apparat in einem gut gelüfteten Abzug aufzustellen und an vier an Stativen befestigten wagerechten Stangen (St 1 bis St 4) aufzuhängen. So ist ein bequemes Arbeiten möglich, ohne daß ein Bruch der gläsernen Teile zu befürchten wäre. Die Zufuhr der Luft erfolgt mit Hilfe einer kleinen Leitung aus Gummischlauch oder Glasrohr von dem nächsten Fenster aus, dessen hölzerner Rahmen in einem entsprechenden Loch durchbohrt ist. Von V 2 führt eine Verbindung zu einer gut saugenden Luftpumpe (Wasserstrahl- oder mechanische Pumpe). Bei Verwendung

eines gläsernen Verteilerrohres mit vier Ansätzen können gleichzeitig sehr gut vier Apparate (für zwei Doppelbestimmungen) laufen. Doch muß der Luftstrom immer *sehr gut* sein, d. h. die Flüssigkeit in den Vorlagen muß sich stets in *lebhafter* Bewegung befinden. Da die Luftdurchsaugung immer eine gewisse Menge von Natriumbisulfit verbraucht, muß solches natürlich reichlich vorgelegt werden.

Die Maße des Apparats sind: für die Gefäße *R*, *V* 1 und *V* 2: 20 × 2,5 cm; Verbindungsglasröhren: 5 mm lichte Weite; Öffnung der Spitzen in den auf den Boden der Gefäße reichenden Röhren: 3 mm; Abstand von *R* zu *V* 1: 30 cm; von *V* 1 zu *V* 2: 15 cm[1]). Größe des Wasser- bzw. Ölbades: 20 × 10 × 15 cm. Als sehr zweckmäßig erwies es sich ferner, einen Thermoregulator einzubauen, wodurch eine Wartung des Apparats während der 1 Stunde beanspruchenden Destillation völlig überflüssig wird. Auch haben wir den Eindruck, daß die Kontrollen besser sind, wenn die Temperatur während des Destillationsprozesses konstant geblieben war. —

Der im vorstehenden beschriebene Apparat, dessen Vorzüge Wegfall organischer Dichtungsmittel und Anwendung reiner Luft sind, eignet sich natürlich auch sehr gut für Arbeiten mit einem Metallbad, das gegenüber dem Ölbad den Vorteil größerer Sauberkeit besitzt. Gegenüber der Destillationsmethode mit Kaliumpermanganat nach *Fürth-Charnas-Embden* hat die Schwefelsäuremethode den nicht zu unterschätzenden Vorzug, daß der Destillationsprozeß in etwa 1 Stunde völlig *automatisch* vor sich geht, und umständliche Beaufsichtigung und peinlich genaues Zutropfen des Oxydationsmittels sich erübrigen. Übrigens gibt auch schon *Clausen* der Schwefelsäuremethode den Vorzug.

Über Einzelheiten des technischen Arbeitens wird weiter unten unter „Gesamtmethodik" gesprochen werden. Vorher sollen nur noch eine Reihe von Vorprüfungen mitgeteilt werden, die nötig waren, ehe die Methode auf das Blut angewandt werden konnte.

Leerbestimmungen.

Wie bereits oben erwähnt, bedingt allein das Hindurchleiten von Luft durch die bisulfitenthaltende Vorlage einen „Luftleerwert", d. h. es wird nach völliger Beseitigung des Bisulfitüberschusses und nachfolgender Alkalisierung eine gewisse Menge titrierbaren Bisulfits wieder frei. Dieser Luftleerwert blieb bestehen, auch als das Eindringen von Öldünsten in den Apparat mit Sicherheit auszuschließen war, und alle Versuche, ihn ganz auszuschalten, schlugen fehl, selbst vorheriges Durchleiten der Luft durch Bisulfitlösung und Kaliumpermanganat (um überschüssiges SO_2 zurückzuhalten) brachte keinen Erfolg. Jedoch stellte es sich heraus, daß bei Verwendung von „Frischluft" der Wert sehr klein und stets konstant war, ganz im Gegensatz zu den vor der Modifikation des Apparats erhaltenen Werten. Er betrug im Mittel aus 12 Versuchen 0,09 n/200 Jod, also etwa 3 Tropfen, wobei es ganz gleichgültig war, ob die Luft ohne oder mit Erhitzung auf 140°, ge-

[1]) Der Apparat kann von der Firma Hormuth und Vetter, Heidelberg, Hauptstraße, bezogen werden.

waschen oder ungewaschen (durch Natriumbisulfit und Kaliumpermanganat) verwendet wurde oder aus einer Preßluftbombe stammte. Der Wert erniedrigte sich überdies, als wir den Inhalt von *V* 1 und *V* 2 gemeinsam in einem Becherglas titrierten auf 0,06 n/200 Jod, 2 Tropfen (acht Versuche).

Weitere Leerbestimmungen mußten ferner mit den Reagenzien angestellt werden. Sie ergaben folgendes: Sowohl Wasser wie Schwefelsäure als auch Wasser und Schwefelsäure zusammen, bei 140° destilliert, ergaben den schon vorher festgestellten Wert von 0,06 n/200 Jod (zehn Versuche).

Für die Verarbeitung von Blut war nun noch folgende Vorprüfung nötig: Wie *Clausen* betont, können im Blute die Eiweißkörper und vor allem der Blutzucker bisulfitbindende Substanzen bilden und demgemäß Milchsäure vortäuschen. Das Eiweiß wird entfernt, indem man es nach *Folin-Wu* mit Natriumwolframat und Schwefelsäure fällt. Die Entzuckerung erfolgt nach *van Slyke* und *Palmer* mit Kupfersulfat und Calciumhydroxyd. Zur Prüfung auf ausreichende Entzuckerung und Reinheit der Reagenzien wurde eine 1proz. Glucoselösung wie Blut verarbeitet, so daß dies nun entstandene Filtrat noch um zehnmal mehr Zucker enthielt wie ein gleiches, tatsächlich aus Blut stammendes *Folin-Wu*-Filtrat. In der unten näher beschriebenen Weise entzuckert, wurde es destilliert, und es ergaben sich folgende Werte (titriert mit n/500 Jod, umgerechnet in n/200 Jod, Inhalt von *V* 1 und *V* 2 in ein Becherglas vereinigt): 0,07, 0,065, 0,065, 0,06, 0,06, 0,06, 0,06, 0,07, 0,07, 0,065. Der Leerwert für eine zehnmal stärkere Glucoselösung, einschließlich Leerwert für Natriumwolframat, Schwefelsäure, Kupfersulfat und Calciumhydroxyd, beträgt also ebensoviel wie derjenige für Luft allein, im Mittel aus zehn Bestimmungen: 0,065 n/200 Jod. Ein Beweis für die ausreichende Entzuckerung und für die Reinheit der Reagenzien.

Es ist demgemäß bei allen Titrationen ein definitiver Leerwert von 0,06 n/200 Jod in Abzug zu bringen.

Prüfung des Apparats mit Lactatlösungen bekannten Gehalts.

Um die Ausbeute und Leistung des Apparats zu prüfen, wurde käufliches Lithiumlactat *Kahlbaum* im Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet und 0,9604 g zur Bereitung einer n/10 Lösung in Wasser zu 100,0 gelöst. In entsprechenden Verdünnungen (n/1000, n/5000 und n/10000) destilliert, fanden wir eine durchschnittliche Ausbeute von 92 bis 95 Proz. Einige Versuchsreihen mögen als Beispiel dienen:

Für 2 ccm n/1000: 0,83, 0,81, 0,81, 0,82, 0,81, 0,82, 0,80, 0,81, 0,79, 0,81, 0,82, 0,80; im Mittel also 0,81 n/200 Jod.

Oder für 10 ccm n/5000: 0,81, 0,79, 0,80, 0,82, 0,84, 0,83, 0,82, 0,80; Mittel 0,82 n/200 Jod (alles einschließlich Leerwert).

Die von uns erzielten Werte seien in einer kleinen Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle I.

Lösung	Destillierte Menge ccm	Vorliegende Milchsäuremenge mg	Theoret. (minus Leerwert)	Gefunden (minus Leerwert)	Proz.	Zahl der Versuche
n/ 1 000	2	0,18	0,80 n/200	0,75 n/200	94	12
n/ 5 000	10	0,18	0,80 n/200	0,76 n/200	95	8
n/10 000	10	0,09	1,0 n/500	0,93 n/500	93	4
n/10 000	5	0,045	0,5 n/500	0,46 n/500	92	4

Bezüglich der von uns erzielten Ausbeute ist zu berücksichtigen, daß das *Kahlbaum*sche Präparat, bei Zimmertemperatur getrocknet, etwa 3 Proz. Wasser enthält[1]) und auch wohl sonst nicht als absolut reines Präparat zu bezeichnen ist. Im Hinblick darauf, daß unsere Methodik in ihren Grundzügen durchweg derjenigen von *Clausen* entspricht, der mit einem selbst dargestellten, sehr reinen Präparat 97 bis 98 Proz. Ausbeute fand, haben wir von komplizierten Reinigungsversuchen und Selbstdarstellung Abstand genommen und uns mit einer konstanten Ausbeute von 92 bis 95 Proz. begnügt. Für ein gutes Präparat dürfte sich wohl auch in unserer Modifikation der Apparatur der gleiche Wert wie der von *Clausen* gefundene erzielen lassen.

Daß bei Zusatz von Lactatlösung zum Oxalatblut und durch die nachträgliche Enteiweißung und Entzuckerung keine zugesetzte Milchsäure verlorengeht, konnten wir ebenfalls bestätigen. Als Beleg diene ein Versuch:

Lactatlösung allein 0,29 n/200 Jod (Leerwert bereits abgezogen); Blut allein 0,37 n/200 Jod; Lactatlösung in gleicher Stärke dem Blut zugesetzt: 0,73, 0,70, 0,66, 0,70; Mittel 0,70, theoretisch 0,66 n/200 Jod.

Ferner ergab die Redestillation einer über 1 Stunde destillierten Lösung keine weitere Ausbeute mehr, so daß wir auch hierin *Clausen* beistimmen können, der den Destillationsprozeß nach 1 Stunde für beendet erklärt.

Nachdem alle Vorprüfungen in befriedigendem Sinne ausgefallen waren, gingen wir zur Bestimmung im Blute über. Die von uns dabei angewandte Methodik sei nun etwas ausführlicher geschildert, da eine Reihe kleiner Einzelheiten für die Erzielung guter Analysen von Wichtigkeit ist.

Gesamtmethodik.

Verzeichnis der erforderlichen Reagenzien: Natrium- oder Lithiumoxalat *Kahlbaum*; Natriumwolframat; n/1 Schwefelsäure; 5proz. Kupfersulfatlösung; Calciumhydroxyd *Merck* (in fester Form); Schwefelsäure, konzentriert, pro analysi; 1proz. Natriumbisulfitlösung; etwa n/5 Jod und genau n/200 Jod; Natriumbicarbonat, pro analysi, gesättigte Lösung; 1 Proz. lösliche Stärke in gesättigter NaCl-Lösung.

Entnahme.

Zur Bestimmung wird Oxalatblut verwendet, das aus der *ungestauten* Vene entnommen wird. Bei Säuglingen bedient man sich mit Vorteil der Sinuspunktion, doch ist unbedingt darauf zu achten, daß die Kinder vorher nicht schreien oder sehr unruhig sind. Schreien während der Dauer der Entnahme ist, soweit wir bemerken konnten, ohne Einfluß.

[1]) *Kuhn* und *Bauer*, Hoppe-Seyler 141, 1924.

Enteiweißung.

Die Enteiweißung geschieht unmittelbar, oder wenigstens bald nach der Entnahme, um Glykolyse zu verhindern, in der üblichen Weise nach *Folin-Wu*, doch verwandten wir n/1 statt $^2/_3$ n Schwefelsäure. Verarbeitet werden 4 ccm, oder wenn man die Enteiweißung direkt in einem großen Zentrifugenglase vornimmt, das mit Gummistöpsel verschlossen ist, so genügen auch schon 3 ccm Oxalatblut. Hat man noch weniger Blut zur Verfügung, so kann man sogar schon mit 1,5 ccm arbeiten; man erhält dann allerdings nur 10 ccm *Folin-Wu*-Filtrat, und muß nun die Kontrollen mit je 5 ccm entzuckerten Filtrats + 5 ccm Wasser ansetzen. Die Genauigkeit der Doppelbestimmungen bleibt bei genügend großer, im Blute zu destillierender Milchsäuremenge dann noch immer ausreichend. Man gebraucht zum Abmessen des Blutes und der Reagenzien zweckmäßigerweise entsprechend große Vollpipetten. Hat man zu große Mengen Oxalat verwendet, so kann die Enteiweißung mißlingen. Die enteiweißten Lösungen können einige Zeit stehengelassen werden, ehe sie weiter verarbeitet werden.

Entzuckerung.

Nach der Enteiweißung werden die Lösungen in großen Zentrifugengläsern (100 × 20 mm) etwa 10 Minuten gut zentrifugiert, um genügend Filtrat zu erhalten. Bei Verwendung von 3 ccm muß länger zentrifugiert werden, sowie ein sehr kleines Filter benutzt werden. Dann wird von dem stets entstehenden Schaum abfiltriert und je 20 ccm klares Filtrat in einem großen Zentrifugenglas mit 8 ccm 5proz. Kupfersulfatlösung und etwa 0,7 g Calciumhydroxyd (mit einem Löffel abgemessen) versetzt und gut geschüttelt. Für eine ausreichende Entzuckerung ist es von größter Bedeutung, daß genügend Calciumhydroxyd zugesetzt wurde, d. h. so viel, daß die Lösung gegen Lackmus deutlich alkalisch ist. Auch empfiehlt es sich, das Filtrat vorher mit Sulfosalicylsäure auf Eiweißfreiheit zu prüfen. Wir verarbeiteten die angesetzten Lösungen meist erst am nächsten Tage. Doch ist nach *van Slyke-Palmer* die Entzuckerung bereits in 1 Stunde beendet, wenn man mehrfach schüttelt (eventuell Probe mit α-Naphthol!). Bezüglich der Haltbarkeit der mit Kupfersulfat und Calciumhydroxyd angesetzten Filtrate konnten wir feststellen, daß über 4 Wochen im Dunkeln und Eisschrank verstöpselt aufgehobene Lösungen Resultate ergaben, die innerhalb der Fehlerbreite der Methode nur um ein geringes differierten.

Destillation.

Zur Destillation wird noch einmal kurz zentrifugiert und filtriert, und je 10 ccm Filtrat in das Reaktionsgefäß des Destillationsapparats abgemessen. Dann wird der Apparat zusammengesetzt, wobei darauf zu achten ist, daß die Schliffe bereits vorher mit etwas Schwefelsäure angefeuchtet sein müssen. In den Falz des oberen Glasrandes kommt eine kleine Menge Schwefelsäure und 10 ccm davon kommen in den Trichter. Die Vorlagen werden mit etwa 10 ccm 1proz. Natriumbisulfitlösung beschickt und *V* 1 durch das Wasserbad gekühlt. Nun wird die Luftpumpe in Betrieb gesetzt, durch Öffnen der Hähne die Schwefelsäure in das Reaktionsgefäß hineingelassen, zuletzt das Ölbad in Gang gebracht. Auf diese Weise wird verhindert, daß schon kleine, bei Erwärmung der Filtrate durch die starke Schwefelsäure frei werdende Aldehydmengen verlorengehen. Die Temperatur des

Ölbades soll während des ganzen Vorganges 148 bis 150° betragen, da bei dieser Außentemperatur die Innentemperatur des Reaktionsgefäßes etwa 140° ist. Nach 1 bis $1^1/_2$ Stunden ist die Destillation beendet, der Luftstrom wird abgestellt, der Inhalt der Vorlagen in entsprechende Bechergläser quantitativ übergeführt, wobei Vorlage 1 und Vorlage 2 eines jeden Apparats in einem Becherglas vereinigt werden.

Einer besonderen Wartung bedarf der Apparat nicht, besonders wenn ein Thermoregulator eingebaut ist. Es empfiehlt sich jedoch, nach ½ Stunde einmal kurz den Luftstrom zu unterbrechen, damit etwa in den Kühlerkugeln haftendes Wasser wieder in das Reaktionsgefäß zurückfallen kann. Zur neuerlichen Destillation muß die im Reaktionsgefäß verbliebene, und bei Eiweißfreiheit ganz klare, sonst aber getrübte Schwefelsäure entfernt werden; beim Ausspülen der Gläser ist peinlich darauf zu achten, daß kein Öl ins Innere des Reaktionsgefäßes gelangt.

Titration.

Bei der Titration wird zuerst alles überschüssige Bisulfit mit Stärke als Indikator durch etwa n/5 Jod beseitigt, kurz vor dem Umschlag jedoch mit n/200 Jod auf einen ganz zarten Endpunkt hin titriert. Hat man übertitriert, so setzt man tropfenweise wieder Bisulfitlösung zu und titriert dann noch einmal mit n/200 Jod. Es ist sehr wichtig, daß dieser „erste Endpunkt" nicht zu stark ist, da alles zu viel zugesetzte Jod natürlich die zweite Titration beeinflußt[1]). Nun wird gesättigte Natriumbicarbonatlösung zugesetzt, so viel, daß die Lösung gegen Lackmus deutlich alkalisch wird, und nunmehr das vorher an den Aldehyd gebunden gewesene, durch die Alkalisierung in Freiheit gesetzte Bisulfit bestimmt. Der „zweite Endpunkt" ist nicht ganz konstant, besonders wenn nur schwach alkalisiert wurde. Deshalb muß während der Titration gut geschüttelt werden, und gilt diese als beendet, wenn die blaue Jodstärkefarbe 1 Minute lang konstant blieb. Bei sorgfältigem Titrieren und auch sonst guter Technik schwanken die Kontrollen höchstens um ± 5 Proz. Es empfiehlt sich dringend, nicht bei künstlicher Beleuchtung zu titrieren.

Berechnung.

Die Berechnung erfolgt, indem 40 ccm n/200 Jod 9 mg Milchsäure entsprechen, unter Berücksichtigung der stattgefundenen Verdünnungen. Z. B.: Verbraucht 0,46 — Leerwert = 0,40 n/200 Jod für 10 ccm entzuckertes *Folin-Wu*-Filtrat. Da 10 ccm *Folin-Wu*-Filtrat (= 1 ccm Blut) mit 4 ccm Kupfersulfatlösung zwecks Entzuckerung versetzt wurden, so würden für 1 ccm Blut $\frac{0{,}4 \cdot 14}{10} = 0{,}56$ ccm n/200 Jod anzusetzen sein. In Milchsäure ausgedrückt, sind 0,56 ccm Jod $\frac{9 \cdot 0{,}56}{40} = 0{,}126$ mg oder für 100 ccm 12,6 mg-Proz.

Zur bequemeren Berechnung haben wir eine Tabelle aufgestellt, die für die verbrauchte Menge n/200 Jod den Milchsäurewert in Milligrammprozent unmittelbar abzulesen gestattet, *wenn 10 ccm entzuckertes Folin-Wu-Filtrat destilliert wurden.* Der Leerwert ist vorher abzuziehen.

---

[1]) Die bis hierher verbrauchte absolute Jodmenge ist für die Berechnung irrelevant.

Tabelle II.

ccm	Milchsäurewerte in mg-Proz. für ccm n/200 Jod									
	Hundertstel ccm									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,6	1,9	2,2	2,5	2,8
0,1	3,1	3,5	3,9	4,2	4,4	4,7	5,0	5,4	5,7	6,0
0,2	6,3	6,6	6,9	7,2	7,5	7,9	8,2	8,5	8,8	9,1
0,3	9,4	9,7	10,1	10,4	10,7	11,0	11,3	11,7	12,0	12,3
0,4	12,6	12,9	13,2	13,5	13,9	14,2	14,5	14,8	15,1	15,5
0,5	15,8	16,1	16,4	16,7	17,0	17,3	17,6	18,0	18,3	18,6
0,6	18,9	19,2	19,5	19,8	20,2	20,5	20,8	21,1	21,4	21,7
0,7	22,1	22,4	22,7	23,0	23,3	23,6	23,9	24,3	24,6	24,9
0,8	25,2	25,5	25,8	26,1	26,5	26,7	27,1	27,4	27,7	28,0
0,9	28,3	28,7	29,0	29,3	29,6	29,9	30,2	30,6	30,9	31,2

Werte.

Die von uns mit der Methode erhobenen Werte betragen für Erwachsene 6,3 bis 11,8 mg-Proz. Sie stimmen also gut mit den von anderen Autoren[1]) mit Hilfe der Makromethoden gewonnenen Werte überein. Über Milchsäurebestimmungen im Säuglingsalter soll später an Hand ausführlicher, auf breiter Grundlage angestellter Untersuchungen berichtet werden.

Zusammenfassung.

1. Im vorstehenden wird eine Modifikation der *Clausen*schen Milchsäuremethode beschrieben und auf verschiedene mögliche Fehlerquellen dieser Methode und ihre Beseitigung hingewiesen.

2. Die Empfindlichkeit der Methode beträgt 92 bis 95 Proz. (käufliches Lithiumlactat). Bei 0,045 mg Milchsäure werden noch 92 Proz. zurückgefunden.

3. Für eine Doppelbestimmung im Blute genügen 3 ccm, aber auch schon 1,5 ccm Oxalatblut.

---

[1]) *Schumacher*, Klin. Wochenschr. 1926, S. 499; *Valentin*, Münch. med. Wochenschr. 1925, S. 86.

Über die Methodik der β-Oxybuttersäurebestimmung in Leber und Muskeln.

Von

J. Snapper und **A. Grünbaum.**

(Aus dem Laboratorium für allgemeine Pathologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Blute verfügen wir über zwei ausgezeichnete Methoden, nämlich über diejenige von *van Slyke* (1) und über das Verfahren von *Engfeldt* (2).

Bei der Methode von *van Slyke* wird das Blut enteiweißt durch Zusatz von $HgSO_4$: im eiweißfreien Filtrat wird durch Kochen mit Schwefelsäure und $HgSO_4$ das Aceton als Hg-haltige Verbindung gefällt und gravimetrisch bestimmt. Nach Abfiltrieren dieser Fällung wird wieder aufgekocht und beim Anfang des Kochens Kaliumbichromat zugesetzt. Hierbei entsteht aus der β-Oxybuttersäure Aceton, das von dem in der Flüssigkeit vorhandenen $HgSO_4$ und Chromsulfat gefällt und als kristallinische chrom- und Hg-haltige Verbindung gewogen wird.

Bei der Methode von *Engfeldt* wird das Blut enteiweißt durch Zusatz von NH_3 und basischem Bleiacetat. Das eiweißfreie Filtrat wird mit Schwefelsäure und Bichromat nach *Shaffer* oxydiert, wodurch wieder aus der β-Oxybuttersäure Aceton entsteht. Im Destillat wird das entstandene Aceton jodometrisch bestimmt.

1. Die Nachteile der beiden Methoden sind: Vorbereitung des Blutes. Diese ist nach der *Engfeldt*schen Methode besser als nach der *van Slyke*schen. Bei der *van Slyke*schen Methode werden durch das $HgSO_4$ nur die Eiweißkörper gefällt, die anderen Substanzen, speziell die Kohlehydrate, bleiben aber im Filtrat anwesend. Bei der *Engfeldt*schen Methode werden durch die Bearbeitung mit NH_3 und Bleiacetat sowohl Eiweiß wie Kohlehydrate gefällt. Diese Entfernung der Kohlehydrate ist äußerst wichtig, weil aus Glucose durch Oxydation mit Bichromat und Schwefelsäure jodbindende Substanzen entstehen, Substanzen, die übrigens auch die *van Slyke*sche Fällung beeinflussen können. Der Glucosegehalt des normalen Blutes ist

aber so niedrig, daß die *van Slyke*sche Methode hierdurch nicht gestört wird, wenn sie nur beim Blute angewendet wird. Bei glykogenhaltigen Organen, wie Muskeln und Leber, ist die Entfernung der Kohlehydrate vor der Oxydation mit Kaliumbichromat absolut erforderlich.

2. Nach dem Fällen bleibt in den enteiweißten Filtraten die Milchsäure anwesend. Bei der Oxydation mit Bichromat wird die Milchsäure, jedenfalls teilweise, zu Acetaldehyd umgesetzt (3). Diese Substanz ist imstande, Jod zu binden und gibt auch bei der *van Slyke*schen Methode, d. h. bei Kochen mit $HgSO_4$, eine Fällung.

Deshalb ist weder die *van Slyke*sche Methode noch die *Engfeldt*sche Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung bei der Untersuchung von Muskeln oder Leber zu benutzen, ohne eingreifende Modifikationen.

Eine sehr gute Methode ist von *Marriott* (4) [und zu gleicher Zeit von *Sassa* (5)] angegeben.

Dieser Untersucher hat das Blut bzw. die fein gemahlenen Organe nach Ansäuern mit Eisessig erst destilliert, wodurch Aceton und Diacetsäure entfernt werden. Der Kolbeninhalt wird dann neutralisiert mit Na_2CO_3, aufgekocht und filtriert und das Filtrat mit NH_3 und basischem Bleiacetat enteiweißt, wodurch zu gleicher Zeit die Kohlehydrate entfernt werden. Das eiweiß- und kohlehydratfreie Filtrat wird dann mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure oxydiert. Das Destillat, das sowohl Aceton wie Acetaldehyd enthält, wird redestilliert mit H_2O_2 und Lauge. Hierdurch wird Acetaldehyd vernichtet, das Aceton aber bleibt unverändert, so daß bei der Redestillation nur das Aceton übergeht. In diesem Redestillat wird das Aceton dann jodometrisch bestimmt.

Diese Methode ist prinzipiell richtig. Fehler können aber durch die Jodtitration des letzten Redestillats entstehen, nachdem das H_2O_2 den Acetaldehyd vernichtet hat. Schon verschiedentlich ist darauf hingewiesen, daß man äußerst vorsichtig sein muß, damit bei dieser Redestillation mit dem Aceton kein H_2O_2 überdestilliert wird; H_2O_2 beeinflußt die Jodtitration, es kann den Jodverbrauch sowohl vergrößern als verringern (6). Wir sind, obgleich wir die allergrößte Vorsicht bei dieser Operation ausgeübt haben, oft Schwierigkeiten hierbei begegnet. Wir haben bekannte Mengen Aceton erst mit H_2O_2 und Lauge gekocht, dann *Fehling*sche Lösung zugesetzt (7), um die letzten Spuren Acetaldehyd zu vernichten und zu gleicher Zeit das H_2O_2 zu binden. Nach der Redestillation haben wir sehr oft gute, aber doch von Zeit zu Zeit wechselnde Resultate bei der Jodtitration erhalten. Diese Schwierigkeiten können überwunden werden, es kommt aber noch etwas dazu. Wir brauchten die Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung für Organe, die mit verschiedenen Substanzen durchströmt waren. Eben hierbei entstehen sehr viele schwer mit H_2O_2 zu oxydierende jodbindende Stoffe. Sehr oft haben wir folgendes beobachtet. Nach Enteiweißung des Muskelbreies, Entfernung der Kohlehydrate, Oxydation des Filtrats mit Bichromat, Redestillation mit H_2O_2 und Lauge und Fehling, haben wir das definitive Destillat in drei Teile geteilt. In einem Teile wurde mit Jod titriert und ergab sich erhebliche Jodbindung. Der zweite Teil wurde nach *van Slyke* mit H_2SO_4 und $HgSO_4$ gekocht; keine Fällung. Im dritten Teile wurde die sehr empfindliche *Trommer*sche Acetonreaktion ausgeführt; negativ. Hieraus ergab sich, daß selbst nach guter Vorbereitung des Organbreies und nach Reinigung des Destillats nach der Bichromatoxydation dennoch jodbindende Stoffe übriggeblieben waren, die nicht mit Aceton identifiziert werden konnten. Wir haben deshalb auf

die jodemetrische Titration des Acetons, bei der *Shaffer*schen Oxydation entstanden, verzichtet. Am Ende hat auch *Marriott* die Jodtitration in diesem Falle aufgegeben und diese Bestimmung auf nephelometrischem Wege mit dem *Scott-Wilson*schen Reagens ausgeführt.

Eigene Methode.

Die Enteiweißung haben wir oft nach *Marriott* vorgenommen, wobei wir dann immer vorsichtshalber das Filtrat nach Blei- und NH_3-Zusatz noch extra mit Kupfersulfat und $Ca(OH)_2$ behandelt haben, um die letzten Reste Kohlehydrat zu entfernen. Wir haben aber den Eindruck, daß für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure in den Organbreien die Enteiweißung nach *Folin* und *Wu* mit Wolframat und H_2SO_4, gefolgt von der Entfernung der Kohlehydrate mit $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$, bessere und konstantere Resultate gibt als die *Marriott*sche Methode[1]). Man kann hier also die Prinzipien anwenden, welche von *Clausen* (8), *Hirsch-Kauffmann* (9) u. a. für die Milchsäurebestimmungen im Blute ausgearbeitet sind.

Für die Oxydation der Filtrate, ungeachtet, ob sie nach der sogenannten *Marriott*schen oder *Folin-Wu*schen Methode erhalten waren, haben wir uns an die *Engfeldt*schen Aufgaben und Regeln gehalten, weil von diesem Untersucher die Bichromatoxydation auf so ausgezeichnete Weise ausgearbeitet ist.

Das Destillat, nach der Oxydation mit Bichromat erhalten, wurde mit H_2O_2 und Lauge behandelt, dann nochmals nach Zusatz von *Fehling*scher Lösung gekocht und dann redestilliert. In diesem Redestillat haben wir das Aceton nicht jodometrisch bestimmt, sondern durch Kochen mit Schwefelsäure und $HgSO_4$ nach *van Slyke* das Aceton gefällt und gravimetrisch bestimmt. Diese gravimetrische Bestimmung wird nicht von Spuren H_2O_2 und wenig von den störenden jodbindenden Stoffen beeinflußt.

Endlich muß man bedenken, daß zu kleine Mengen Aceton beim Kochen mit H_2O_2 und Lauge angegriffen werden können (10). Wenn also ganz kleine Mengen β-Oxybuttersäure anwesend sind, muß man

---

[1]) Für die Bestimmung von Aceton und Diacetsäure ist aber die direkte Destillation des Organbreies nach Zusatz von Essigsäure die beste Methode. Hierfür wird am besten die Methode der Dampfdestillation angewandt, um dem Verbrennen des Organbreies vorzubeugen. Jedenfalls haben wir hiermit konstantere Resultate bekommen, als wenn wir vorher den Organbrei auf irgend eine Weise enteiweißt hätten.

Das Destillat vom angesäuerten Organbrei muß wieder erst mit H_2O_2 und Lauge, nachher mit *Fehling*scher Lösung gekocht und redestilliert werden, wonach der Acetongehalt des Redestillats durch Kochen mit H_2SO_4 und $HgSO_4$, eventuell durch Jodtitration, ermittelt wird.

dem Destillat, das bei der Oxydation mit Bichromat erhalten wird, eine bekannte Menge Aceton (4 bis 5 mg) zusetzen, bevor man zur Redestillation mit H_2O_2 und Lauge oder mit *Fehling*scher Lösung schreitet. Von dem Gewicht der endgültigen *van Slyke*schen Fällung muß natürlich die Fällung, verursacht vom zugegebenen Aceton, abgezogen werden.

Die genaue Methode für die β-Oxybuttersäurebestimmung in Muskeln und Leber ist dann folgende:

50 g Leber- oder Muskelbrei werden mit 400 g Wasser und 50 ccm $^2/_3$ n H_2SO_4 versetzt und in einem Literkolben während mehrerer Stunden stehengelassen. Dann werden 50 ccm 10proz. Natriumwolframat zugesetzt und geschüttelt. Auffüllen mit Wasser auf 1 Liter. Nach einigen Stunden Stehens wird filtriert und 750 ccm des wasserklaren, eiweißfreien Filtrats mit 40 ccm 10proz. $CuSO_4$ und 100 ccm 20proz. Kalkmilch versetzt; dann wird auf 1 Liter aufgefüllt und in einem Erlenmeyerkolben während $^1/_2$ Stunde stehengelassen (von Zeit zu Zeit durchschütteln). Bei der Filtration bekommt man ein klares, eventuell leicht blaugefärbtes Filtrat. Hiervon werden 600 ccm (die den β-Oxybuttersäuregehalt von $\frac{750}{1000} \times \frac{600}{1000} \times 50 = 22{,}5$ g Organbrei enthalten) mit 17 ccm 95proz. H_2SO_4 (S.-G. 1,84) versetzt und 10 Minuten destilliert, um Aceton und Diacetsäure zu entfernen. Dieses Destillat wird verworfen[1]). Nach dieser Destillation werden durch einen Scheidetrichter zu der kochenden Flüssigkeit auf einmal 50 ccm Kaliumbichromat (50 g $K_2Cr_2O_7$, 950 ccm Aqua dest., 56 ccm 95proz. H_2SO_4) zugesetzt (Flamme einen Augenblick wegnehmen) und jetzt 25 Minuten stark gekocht[2]). Das neue Destillat enthält das Aceton, das durch Oxydation der β-Oxybuttersäure entstanden ist. Wie *Engfeldt* nachgewiesen hat, ist diese Oxydation nicht vollständig. Wenn man sich aber an die hier befolgten *Engfeldt*schen Regeln hält, ist man sicher, daß immer etwa 70 Proz. der β-Oxybuttersäure als Aceton übergehen. Dieses Destillat muß nun weiter verarbeitet werden.

Hierzu werden zum Destillat 10 ccm 10proz. NaOH, 20 ccm 3proz. H_2O_2 (chemisch reines Perhydrol *Merck* ohne Konservierungsmittel) und etwas Talkum[3]) zugesetzt. Dann wird der Kolben an den aufsteigenden

---

[1]) Weil es gewöhnlich niedrigere Zahlen für Aceton und Diacetsäure gab, als bei der direkten Destillation des angesäuerten Blutes oder Organbreies erhalten wurden.

[2]) Siehe Destillationsapparat *Engfeldt*, Zeitschr. f. phys. Chem. **99**, 221, 1917. Nur haben wir für die Verbindung zwischen Destillationskolben, Scheidetrichter und Kühler keine Korken oder Gummistopfen, sondern Schleifstücke benutzt. Manchmal haben wir nicht 600 ccm, sondern 900 ccm Filtrat für die Oxydation mit Bicarbonat-Schwefelsäure genommen. Dazu haben wir dann einen Destillationskolben von 1½ Liter benutzt und 1½mal größere Mengen von Schwefelsäure bzw. Bichromatlösung zugesetzt.

[3]) Wenn nur kleine Mengen Aceton vorhanden sind, werden zu gleicher Zeit 20 ccm einer 0,02proz. Acetonlösung zugesetzt, um Acetonverluste bei der Oxydation des Acetaldehyds mittels H_2O_2 vorzubeugen.

Kühler des etwas modifizierten[1]) Doppeldestillationsapparats nach *Embden* und *Baldes* (11) angeschlossen; am absteigenden Kühler ist ein leerer Erlenmeyer (600 ccm) als Vorlage befestigt. Von der Außenluft ist die Vorlage durch ein Peligotrohr mit Wasser abgetrennt. Jetzt wird 20 Minuten mit kleiner Flamme erwärmt, während die beiden Kühler mit kaltem Wasser

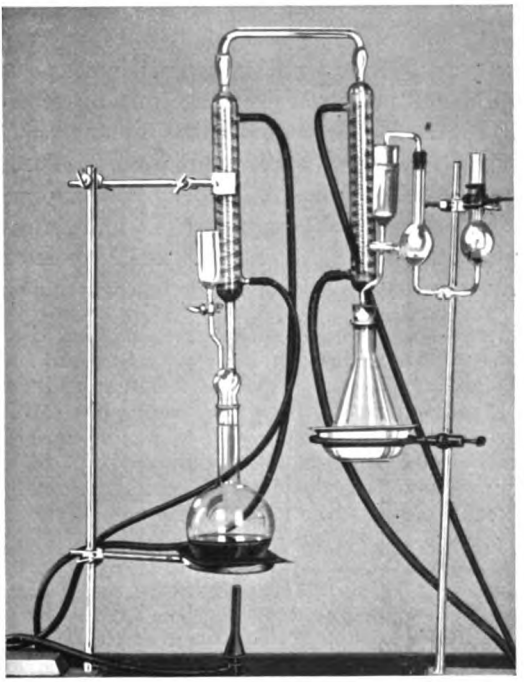


Abb. 1.

durchströmt werden. Hierbei entwickelt sich reichlich Sauerstoff. Dann wird während 20 Minuten schwach gekocht. Jetzt läßt man durch den Scheidetrichter eine Lösung zufließen, die aus 20 ccm Fehling I, 10 ccm Fehling II und 10 ccm Seignettesalz (346 g pro Liter) zusammengesetzt ist. Der aufsteigende Kühler wird dann außer Betrieb gestellt und nun wird während 15 Minuten überdestilliert. Das Destillat wird mit der Flüssigkeit aus dem Peligotrohr vereinigt, dann mit 10 ccm 50proz. H_2SO_4 und

[1]) Unser Apparat unterscheidet sich in drei Details von dem *Embden-Baldes*schen. 1. Die zwei Kühler sind nicht durch ein Schleifstück oder einen Gummistopfen miteinander verbunden, sondern aus einem Stück Glas geblasen. 2. Weil wir während der Operation Flüssigkeit zufließen lassen, haben wir beiderseits einen Trichter mit Hahn angebracht, der in den Destillationskolben bzw. in den Rezipienten einmündet. 3. Bei der Destillation wird der Rezipient von der Außenluft abgeschlossen mittels eines Peligotrohres, das durch einen Stopfen im Scheidetrichter befestigt wird. Durch die Abbildung werden diese Details verdeutlicht.

35 ccm 10proz. $HgSO_4$ versetzt, wonach am gewöhnlichen Rückflußkühler nach *van Slyke* 45 Minuten schwach gekocht wird. Der in dieser Zeit gebildete Niederschlag wird durch einen gewogenen *Gooch*-Tiegel abfiltriert, bis zum konstanten Gewicht bei 105 bis 110° getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator gewogen.

Um die Methode zu prüfen, wurden folgende blinde Versuche angestellt:

Erst haben wir uns von der Richtigkeit der *Engfeldt*schen Angabe überzeugt, daß beim Innehalten der von ihm angegebenen Fürsorgen tatsächlich 70 Proz. der anwesenden β-Oxybuttersäure durch die Bichromatoxydation in Aceton übergeführt werden. Dann untersuchten wir, ob bei der Vernichtung des Acetaldehyds im Doppeldestillationsapparat von *Embden* und *Baldes* mittels H_2O_2 und Lauge und *Fehling*scher Lösung kein Aceton verlorengeht. Auch dieses war nicht der Fall. Von den vielen Kontrollversuchen geben wir nur ein Beispiel.

10 ccm einer Lösung des chemisch reinen Zink-Calciumsalzes der β-Oxybuttersäure werden mit 20 ccm 20proz. $CuSO_4$ und 100 ccm $Ca(OH)_2$ versetzt. Auffüllen auf 500 ccm. Filtrieren. 350 ccm Filtrat und 250 ccm Aqua dest. mit 17 ccm 95proz. H_2SO_4 werden während 10 Minuten destilliert. Destillat verworfen. Zusatz von Bichromatlösung nach *Engfeldt*, 25 Minuten kochen. Dieses Destillat wird im *Embden-Baldes*-Apparat mit NaOH und H_2O_2 und Fehling behandelt, das Redestillat nach *van Slyke* mit H_2SO_4 und $HgSO_4$ gekocht. Es entstand eine Fällung von 44,1 mg.

Weil nur 350 ccm Filtrat verarbeitet waren, wurde also der β-Oxybuttersäuregehalt von $\frac{350}{500} \times 10$, also 7 ccm Zink-Ca-Lösung bestimmt.

10 ccm der Zink-Ca-Lösung, direkt nach *van Slyke* bestimmt, gaben eine Fällung von 63,5 mg.

Es müßten theoretisch also im obenstehenden Versuch $^7/_{10} \times 63{,}5$, also 44,4 mg Fällung gefunden werden. Tatsächlich wurden 44,1 mg bestimmt.

Dann kam die Frage, ob bei der Enteiweißung nach *Folin* und *Wu* und nachfolgender Behandlung mit Kupfer und Kalk keine Adsorption der β-Oxybuttersäure zu befürchten war.

Es wurden vier Portionen Leberbrei, à 50 g, abgewogen.

Zu zwei Portionen (a, b) wurden 20 ccm einer schwachen β-Oxybuttersäurelösung (± 2,2 mg β-Oxybuttersäure) zugesetzt, dann mit Natriumwolframat und H_2SO_4 enteiweißt, $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$ zugesetzt, mit Bichromat oxydiert und das Destillat weiter verarbeitet.

Zwei andere Portionen (c, d), à 50 g, Leberbrei, wurden ohne Zusatz von β-Oxybuttersäure enteiweißt und mit $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$ behandelt. Dann wurden vor der Oxydation mit Bichromat äquivalente Mengen β-Oxybuttersäure (9 ccm) zugesetzt und weiter wie in den ersten zwei Portionen verfahren. Aus diesem Versuch muß sich ergeben, ob man bei der Fällung mit Wolframat und H_2SO_4 und bei der Behandlung mit $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$ Verluste zu befürchten hat.

Versuch 1.

50 g Leberbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung .	Fällung	128,7	mg
Dasselbe	,,	131,2	,,
50 g Leberbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	130,5	,,
Dasselbe	,,	132,0	,,

Versuch 2.

50 g Leberbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung .	Fällung	120,5	mg
Dasselbe	,,	119,2	,,
50 g Leberbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	117,4	,,
Dasselbe	,,	120,7	,,

Versuch 3.

50 g Leberbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung .	Fällung	100,4	mg
Dasselbe	,,	108,4	,,
50 g Leberbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	104,25	,,
Dasselbe	,,	101,7	,,

Versuch 4.

50 g Leberbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung .	Fällung	114,0	mg
Dasselbe	,,	116,8	,,
50 g Leberbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	120,8	,,
Dasselbe	,,	120,4	,,

Dieselben Versuche wie mit Leberbrei haben wir auch mit Muskelbrei angestellt.

Versuch 1.

50 g Muskelbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung	Fällung	88,2	mg
Dasselbe	,,	90,4	,,
50 g Muskelbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . . .	,,	91,7	,,
Dasselbe	,,	90,3	,,

Versuch 2.

50 g Muskelbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung	Fällung	87,4	mg
Dasselbe	,,	90,7	,,
50 g Muskelbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	88,9	,,
Dasselbe	,,	90,4	,,

Versuch 3.

50 g Muskelbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung	Fällung	92,2	mg
Dasselbe	,,	92,3	,,
50 g Muskelbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt . .	,,	91,9	,,
Dasselbe	,,	(?) 81,9	,,

Versuch 4.

50 g Muskelbrei und 20 ccm β-Oxybuttersäurelösung	Fällung	104,9 mg
Dasselbe	„	102,4 „
50 g Muskelbrei, enteiweißt, 9 ccm β-Oxybuttersäurelösung vor der Bichromatoxydation zugesetzt	„	106,1 „
Dasselbe	„	102,4 „
Dasselbe	„	110,3 „

Auch beim Blute gibt diese Methode ausgezeichnete Resultate. Wegen Platzmangel unterlassen wir die Beleganalysen. Inzwischen sei ausdrücklich betont, daß man für die β-Oxybuttersäurebestimmung im Blute mit der unmodifizierten Methode von *van Slyke* und besonders mit der Methode von *Engfeldt* ausgezeichnete Resultate bekommt.

Beispiel der Berechnung:

50 g Schafsleberbrei bei der Enteiweißung nach *Folin* und *Wu* mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. 750 ccm Filtrat mit $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$ auf 1 Liter aufgefüllt. 600 ccm Filtrat zur Bichromatoxydation verwendet. Zum Destillat vor der Redestillation mit H_2O_2 20 ccm einer 0,02proz. Acetonlösung zugesetzt. Fällung bei der endgültigen *van-Slyke*-Analyse 98,1 mg.

Diese Fällung stammt außer von den zugesetzten 4 mg Aceton auch von dem Aceton, das bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure, vorhanden in $\frac{750}{1000} \times \frac{600}{10} \times 50 = 22{,}5$ g Leberbrei, entstanden ist.

Bei der Methode von *van Slyke* bekommt man eine Fällung, die 20mal größer ist als die zu bestimmende Menge Aceton. Die zugesetzten 4 mg Aceton geben 80 mg Fällung. Bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure, enthalten in 22,5 g Leberbrei, entstehen also $\frac{98{,}1 - 80}{20} = \frac{18{,}1}{20}$ mg Aceton. Bei der *Engfeldt*schen Oxydation entsteht nur eine Acetonausbeute von 70 Proz. In 22,5 g Leberbrei ist also so viel β-Oxybuttersäure vorhanden, als übereinstimmt mit $\frac{18{,}1}{20} \times \frac{10}{7}$ mg Aceton, d. h. umgerechnet nach den Molekulargewichten, $\frac{104}{58} \times \frac{18{,}1}{20} \times \frac{10}{7} = 2{,}31$ mg β-Oxybuttersäure; pro Kilogramm Leber also $\frac{1000}{22{,}5} \times 2{,}31$ mg $= 102$ mg β-Oxybuttersäure.

Wenn die hier angeführten Zahlen und Verhältnisse beibehalten werden, kann man einfach die Zahl der Milligramme, bei der endgültigen *van-Slyke*-Fällung entstanden, dividieren durch 0,18; man bekommt dann ungefähr den β-Oxybuttersäuregehalt pro Kilogramm Organbrei.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung in Leber und Muskeln angegeben, wobei nach Enteiweißung mit Wolframat und Schwefelsäure die Kohlehydrate mit $CuSO_4$ und $Ca(OH)_2$ entfernt werden. Oxydation der β-Oxybuttersäure mit Bichromat nach *Shaffer-Engfeldt*, Reinigung des gebildeten Acetons durch Redestillation mit NaOH, H_2O_2 und *Fehling*scher Lösung. Hiernach gravimetrische Bestimmung des gebildeten Acetons als Hg-Salz nach *van Slyke*.

Die gewöhnliche Jodtitration des Acetons wird hierbei also vermieden, ein Vorteil, der besonders bei den β-Oxybuttersäurebestimmungen in Leber- und Muskelbrei schwer wiegt, weil aus den Bestandteilen dieser Organe bei der Bichromatoxydation viele, schwer mit H_2O_2 zu zerstörende, jodbindende Stoffe gebildet werden.

Weder bei der Enteiweißung mit Wolframat und H_2SO_4 noch beim Zusatz von Kupfer und Kalk wird β-Oxybuttersäure an die Fällung adsorbiert.

Wohl muß man bedenken, daß die Bichromatoxydation nach *Engfeldt* nur *ungefähr* 70 Proz. der β-Oxybuttersäure in Aceton umsetzt. Dazu kommt, daß man bei der Fällung des Acetons als Hg-Salz nach *van Slyke* zwar gewöhnlich das 20fache Gewicht des Acetons erhält, aber auch hier sind kleine Schwankungen möglich.

Wenn auch die hier angegebene Methode die Unsicherheiten der gewöhnlichen β-Oxybuttersäurebestimmungen umgeht, so können dennoch Schwankungen von 5 bis 10 Proz. in den Resultaten *gelegentlich* vorkommen.

Literatur.

1) *van Slyke* und *Fitz*, Journ. of biol. Chem. **32**, 17; siehe auch *Schmitz* in Abderhaldens physiol. Arbeitsmethod. — 2) *Engfeldt*, Beitr. z. Kenntnis d. Acetonkörp., Lund 1920; diese Zeitschr. **144**, 556, 1924. — 3) *Mondschein*, diese Zeitschr. **42**, 91, 1912. — 4) *Marriott*, Journ. of biol. Chem. **16**, 281, 1914; **18**, 241, 507, 1914. — 5) *Sassa*, diese Zeitschr. **59**, 362, 1914. — 6) *Engfeldt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**, 193, 1917. — 7) *Stepp* und *Fricke*, ebendaselbst **116**, 297, 1921. — 8) *Clausen*, Journ. of biol. Chem. **52**, 276, 1922; *Anrep* und *Cannon*, Journ. of Physiol. **58**, 244, 1923. — 9) *Hirsch-Kauffmann*, Zeitschr. f. phys. Chem. **140**, 25, 1924; *Embden*, ebendaselbst **143**, 297, 1925. — 10) *Goldblatt*, Biochem. Journ. **19**, 948, 1925. — 11) *Embden* und *Baldes*, diese Zeitschr. **45**, 160, 1912.

Über den β-Oxybuttersäuregehalt von Muskeln und Leber.

Von

J. Snapper und **A. Grünbaum.**

(Aus dem Laboratorium für allgemeine Pathologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 14. Juni 1926.)

Wir verfügen über verschiedene Angaben über den Gehalt der Organe des normalen tierischen Organismus an Ketokörpern. Diese Zahlen sind auf verschiedene Weise gewonnen. Was die β-Oxybuttersäure angeht, muß man in erster Linie die *Magnus-Levy*schen (1) Angaben nennen, welche erhalten sind durch die Bestimmung der Linksdrehung des Ätherextrakts der Organe. In neuerer Zeit hat man nach Enteiweißung des Organbreies die β-Oxybuttersäure nach *Shaffer* mit Kaliumbichromat zu Aceton oxydiert und dann das Aceton, erhalten durch die Oxydation der β-Oxybuttersäure, jodometrisch bestimmt. In unserem vorigen Aufsatz haben wir angegeben, welches die Gefahren sind, wenn man jodometrisch das Aceton bestimmen will, welches bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure gewonnen ist. Wenn diese Methode auf Organbreie angewandt wird, besteht immer die Möglichkeit, daß andere jodbindende Oxydationsprodukte einen höheren β-Oxybuttersäuregehalt vortäuschen, als tatsächlich vorhanden ist, selbst wenn man das erhaltene Aceton durch Redestillation mit H_2O_2 und Lauge reinigt. Doch sind die besten Zahlen über den β-Oxybuttersäuregehalt von tierischen Organen mit dieser Jodmethode erhalten. Es sind die Untersuchungen von *Marriott* (2) einerseits, von *Sassa* (3) andererseits. Beide Untersucher haben offenbar die Schwierigkeit bei der jodometrischen Bestimmung des Acetons empfunden. Jedenfalls hat *Marriott* nachher die jodometrische Bestimmung verlassen und das Aceton nephelometrisch mit dem *Scott-Wilson*schen Reagens bestimmt (4), während *Sassa* in zwei Versuchen den β-Oxybuttersäuregehalt von Pferdefleisch nicht nur durch *Shaffer*sche Oxydation zu Aceton bestimmt hat, sondern seine Zahlen durch Oxydation der β-Oxybuttersäure mit 60proz. H_2SO_4 zu Crotonsäure kontrolliert hat.

Auch wir haben unsere Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung in den Organen, wobei das Aceton, bei der *Shaffer*schen Oxydation

gebildet, nach *van Slyke* gravimetrisch bestimmt wird (5), gebraucht, um den β-Oxybuttersäuregehalt von Leber und Muskeln zu ermitteln.

In nachfolgenden Tabellen haben wir unsere Zahlen zusammengestellt und mit den *Marriott*schen und *Sassa*schen verglichen. Es ist auffallend, daß unsere Zahlen für die Muskeln des Hundes und der meisten gewöhnlichen Schlachttiere (Tabelle I) im allgemeinen beträchtlich niedriger liegen als die *Marriott*schen und die *Sassa*schen. Vielleicht können die Schwierigkeiten bei der jodometrischen Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Muskelbrei diesen Unterschied erklären.

Was die Leber anbelangt, haben wir in der Leber des Hundes, die immer gleich nach dem Tode des Tieres analysiert wurde, auch niedrigere Zahlen gefunden. Einmal, wo wir eine Schafsleber gleich nach dem Schlachten analysieren konnten, wurden ebenfalls niedrige β-Oxybuttersäurezahlen erhalten. Die gewöhnlichen Lebern der Schlachttiere, welche aus den Kühlzellen des Schlachthauses erhalten wurden, gaben aber einen β-Oxybuttersäuregehalt, welcher gewöhnlich mit dem von *Marriott* und *Sassa* ermittelten übereinstimmte (Tabelle II). Es scheint uns nicht unmöglich, daß die Frische des Organs mit diesem Unterschied zusammenhängt.

Tabelle I.

Muskeln	Pro kg Organbrei: Aceton + Diacetsäure mg	Pro kg Organbrei: β-Oxybuttersäure mg	
Hund	4	234	*Marriott*
Ochse	—	226	*Marriott*
Hund	—	143	*Sassa*
Rind	—	205	*Sassa*
Schwein	—	123	*Sassa*
Pferd	—	173	*Sassa*
Mensch	—	177	*Sassa*
Hund	Spuren	40	Eigene Analysen
„	„	20	Eigene Analysen
Kalbszunge	„	28,4	Eigene Analysen
„	„	34	Eigene Analysen
„	„	54	Eigene Analysen
„	„	69	Eigene Analysen
„	„	78	Eigene Analysen
„	„	48	Eigene Analysen
„	„	40	Eigene Analysen
„	„	52	Eigene Analysen
Beefsteak	„	48	Eigene Analysen
„	„	45	Eigene Analysen
„	„	33	Eigene Analysen
„	„	30	Eigene Analysen
Schaf	—	34	Eigene Analysen
Ochse	—	111	Eigene Analysen

Tabelle II.

Leber		Pro kg Organbrei: Aceton + Diacetsäure mg	Pro kg Organbrei: β-Oxybuttersäure mg	
	Hund	2	342	*Marriott*
	„	7	238	
	Ochse	—	321	
	Hund	—	168	*Sassa*
	„	—	134	
	Mensch	—	189	
Direkt nach dem Tode analysiert	Hund	Spuren	60	Eigene Analysen
	„	„	69	
	„	„	40	
	Schaf	—	100	
Aus der Kühlzelle des Schlachthofs	„	—	179	
	„	—	195	
	„	—	178	
	„	—	246	
	„	—	240	
	Kalb	—	90	
	„	—	109	
	Ochse	—	100	

Endlich möchten wir noch einige Worte sagen über das sogenannte β-Verhältnis, das von *Kennaway, Pembrey* und *Poulton* aufgestellt ist (6). Das β-Verhältnis ist das Verhältnis zwischen β-Oxybuttersäure (ausgedrückt als Aceton) und dem totalen Ketonkörpergehalt (d. h. Aceton, Diacetsäure und β-Oxybuttersäure, auch als Aceton berechnet). *Marriott* hat angegeben, daß dieses β-Verhältnis im acidotischen Blute zwischen 52 und 79 Proz. variiert (4), während in den Geweben des acidotischen Tieres das Verhältnis viel höher ist, d. h. in den Geweben relativ mehr Oxybuttersäure als Diacetsäure ist, verglichen mit den Verhältnissen im Blute. *Marriott* hat nur eine Analyse von Muskeln und Leber eines acidotischen Tieres angegeben, um diese Regel zu bestätigen. Auch wir finden in den *Muskeln* des acidotischen Hundes immer relativ wenig Aceton und Diacetsäure, auch wenn große Mengen β-Oxybuttersäure vorhanden sind, während im Blute des acidotischen Tieres relativ viel Aceton und Diacetsäure nachzuweisen sind (Tabelle III).

Marriott meint, daß dieser Unterschied zwischen dem β-Verhältnis im Blute einerseits und den Geweben andererseits zusammenhängt mit der Tatsache, daß die Gewebe viel leichter Diacetsäure abbauen können als β-Oxybuttersäure. Der niedrigere Diacetsäuregehalt der Gewebe ist dann also der Ausdruck der Oxydation der Diacetsäure, welche in den Geweben stattgefunden hat, während die β-Oxybuttersäure kaum angegriffen wird.

Tabelle III.

		Pro Liter Blut bzw. pro kg Organbrei: Aceton + Diacetsäure mg	β-Oxybuttersäure mg	β-Verhältnis Proz.	
Acidotischer Hund	Blut	76	260	65	*Marriott*
	Muskeln	13	170	87	
Acidotischer Hund	Blut	61	178	62	Eigene Analysen
	„	83,5	191	56	
	„	35	79	55	
	„	29	67	56	
	„	50	133	60	
	„	266	400	46	
	„	61	142	57	
	„	29	130	72	
	„	36	80	56	
	Muskeln	16	144	83	
	„	6,3	222	95	
	„	4	44	86	
	„	6	143	93	

		Aceton + Diacetsäure mg	β-Oxybuttersäure mg	β-Verhältnis*) Proz.	
Diabetes-patienten	Blut	242	750	63½	Eigene Analysen
	„	250	706	62	
	„	107	450	70	
	„	48	188	68½	
	„	46	113	59	

*) $\beta\text{-Verhältnis} = \frac{\beta\text{-Oxybuttersäure, berechnet als Aceton}}{\text{Total-Aceton (Aceton + Diacetsäure + } \beta\text{-Oxybuttersäure, alles berechnet als Aceton)}}$

Zusammenfassung.

1. Mit unserer Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung, wobei die jodometrische Acetonbestimmung nach der *Shaffer*schen Oxydation der β-Oxybuttersäure vermieden wird, finden wir beträchtlich niedrigere Zahlen für den β-Oxybuttersäuregehalt der normalen Muskeln als die früheren Untersucher *(Marriott, Sassa)*.

2. Auch in der normalen Leber finden wir, wenn die Leber ganz frisch ist, niedrigere Zahlen. Bei den Schlachthauslebern finden wir aber Zahlen, die im allgemeinen mit denen der vorigen Untersucher übereinstimmen.

3. Die Angaben *Marriotts*, daß das β-Verhältnis

$$\frac{\beta\text{-Oxybuttersäure (als Aceton angegeben)}}{\text{Aceton + Diacetsäure + } \beta\text{-Oxybuttersäure}}$$

im Blute niedriger ist als in den Geweben, d. h. daß in den Geweben relativ wenig Diacetsäure im Verhältnis zu β-Oxybuttersäure anwesend ist, können wir bestätigen.

Literatur.

1) *Magnus-Levy*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. **42**, 149, 1899. — 2) *Marriott*, Journ. biol. Chem. **16**, 293, 1914. — 3) *Sassa*, diese Zeitschr. **59**, 362, 1914. — 4) *Marriott*, Journ. biol. Chem. **19**, 507, 1914. — 5) *Snapper* und *Grünbaum*, vorige Mitteilung. — 6) *Kennaway*, *Pembrey* und *Poulton*, Journ. of physiol. **47** (Proceedings), 1913.

Über eine neue kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Kohlehydrate in Organen und Körpersäften.

Von

Zacharias Dische und **Hans Popper.**

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einleitung 372

II. Reaktionen der Kohlehydrate mit Skatol und in Indol in salzsaurer und schwefelsaurer Lösung 375

A. Versuche über die Reaktion der Kohlehydrate mit Skatol und Salzsäure 375

a) Abhängigkeit der Farbstärke der Reaktion von der Zeitdauer des Erhitzens, der Größe des Skatolzusatzes und der Konzentration des Zuckers bei Verwendung von Säure vom spezifischen Gewicht 1,175 375

b) Reaktion der verschiedenen Kohlehydrate mit Skatol und konzentrierter Salzsäure 376

c) Reaktion der Kohlehydrate mit Skatol bei Verwendung verdünnter Salzsäure 377

B. Reaktionen der Kohlehydrate mit Indol und Salzsäure . . . 378

a) Bei Verwendung von Säure vom spezifischen Gewicht 1,175 378

1. Abhängigkeit der Farbe von der Dauer des Erhitzens und der Konzentration der verwendeten Reagenzien . 378

2. Abhängigkeit der Farbe von der Kohlehydratkonzentration 378

b) Verwendung von 10- und 20proz. Salzsäure 379

C. Reaktionen der Kohlehydrate mit Indol bei Verwendung verschieden konzentrierter Schwefelsäure 380

a) Versuche mit Glucose 380

1. Versuche über den Einfluß der Säurekonzentration . . 380

2. Einfluß der Dauer des Erhitzens 381

3. Einfluß der Größe des Indolzusatzes 381

4. Einfluß der Glucosekonzentration 382

5. Versuche über die Haltbarkeit des Farbstoffs 385

Seite
b) Verhalten anderer Kohlehydrate 385
c) Verhalten von Substanzen, die durch geringe Änderungen des Zuckermoleküls aus diesem gebildet werden 387
d) Die Farben von Eiweißkörpern und Nucleinsäuren 389
e) Die Spezifität der Reaktion 390
f) Versuche über den Einfluß nicht kohlehydratartiger Substanzen auf den Farbtiter der Kohlehydrate 392
1. Versuche mit Alanin 392
2. Versuche mit Casein 392
3. Caseinhydrolysate 392
4. Mischungsversuche mit Aceton 392
5. Über die Reaktion von Gemischen verschiedener im Blute vorkommender Substanzen und ihre Verwendung zu Mischungsversuchen 393
6. Einfluß von Beimischungen von Salzsäure zur Glucoselösung 393
D. Über die Reaktion von Monohexosen in alkoholischer Lösung mit Indol und Schwefelsäure 394
E. Zusammenfassung von II 395
III. Methode zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen . 397
Vorschrift über die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen 398
Vergleich über die Resultate dieser Methode mit denen nach *Neuberg-Löwi* 401
IV. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Blute 402
Enteiweißung des Blutes zur Bestimmung der Kohlehydrate 404
Versuch mit Ausfällung der Kohlehydrate im Blute 405
Vorschrift für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Blute 406
Vergleich der nach dieser Methode gefundenen Werte mit den Blutzuckerwerten von *Bang* und *Benedict* 407
V. Zusammenfassung 408

I. Einleitung.

Die bisher üblichen Methoden zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate und der Glucose in den Organen und Körpersäften basierten auf den *reduzierenden* Eigenschaften des Traubenzuckers. Deswegen pflegt man bei der Ermittlung des Gehalts an Gesamtkohlehydraten die Organe, eventuell nach vorheriger Auflösung in konzentrierter Kalilauge, zunächst einer kurzdauernden Hydrolyse in *verdünnten Mineralsäuren* zu unterwerfen, wobei die gesamten komplexen Kohlehydrate in Glucose übergeführt werden, ohne daß bei der kurzen Dauer der Hydrolyse die Glucose eine Veränderung erfährt. *Lépine* und seine Mitarbeiter haben zur Bestimmung der an Eiweiß gebundenen Kohlehydrate des Blutes statt verdünnter Mineralsäuren *konzentrierte Fluorwasserstoffsäure* angewendet, die ebenfalls auch bei längerer Einwirkung

keinerlei Zerstörung der Kohlehydrate bewirkt. Diese Methode erfordert jedoch eine umständliche Apparatur. Daher wird heute meist das erstere Verfahren angewendet.

Nach der Überführung der komplexen Kohlehydrate in Glucose wurden dieselben bei den bisher üblichen Verfahren nach einer der unzähligen Methoden bestimmt, die auf ihrer *Reduktionskraft* beruhen. Nun besitzen sehr zahlreiche, in Organen und Körpersäften bzw. deren Hydrolysaten vorkommende, besonders organische Stoffe ein erhebliches Reduktionsvermögen. Will man also die Glucose nach einem derartigen Verfahren bestimmen, so muß man vorher alle diese Substanzen möglichst vollständig entfernen. Dies erfordert ein ziemlich umständliches Verfahren.

So bilden sich z. B. bei der Gesamtkohlehydratbestimmungsmethode nach *O. Löwi*[1]), die sich bisher am besten bewährt hat, durch die zweistündige Hydrolyse mit 2,2proz. Salzsäure aus dem Organeiweiß Peptone und aus den Nucleoproteiden Purinsubstanzen, die zum Teil ein erhebliches Reduktionsvermögen besitzen und mit den gebräuchlichen Eiweißfällungsmitteln nicht mehr ausfallen. Diese Stoffe muß man zunächst durch Fällung mit Quecksilberacetat nach *Neuberg*[2]) nach vorheriger Neutralisation des Hydrolysats entfernen. Es bleiben immer noch N-haltige Substanzen in Lösung, die jedoch nach *Löwi* alkalische Kupferlösung, wie sie z. B. bei der Methode nach *Bertrand* verwendet wird, nicht mehr reduzieren sollen.

Das soeben beschriebene Verfahren ist sehr umständlich, da das zur Fällung des Peptons usw. verwendete Hg wieder mit H_2S entfernt werden muß, der H_2S hingegen, der selbst ein starkes Reduktionsvermögen besitzt, durch Durchleiten von Luft vertrieben werden muß. Dies bedingt wiederholtes Abfiltrieren von massigen Niederschlägen und infolgedessen große Verluste an Material. Da nun die gebräuchlichen Methoden der Glucosebestimmung mit Hilfe der alkalischen Kupferlösungen verhältnismäßig große Mengen beanspruchen, andererseits die Verdünnung der Glucose eine bestimmte Grenze nicht unterschreiten darf, so ist das Verfahren von *Neuberg-Löwi* für diejenigen Fälle, wo man mit wenig Material auskommen muß, unverwendbar.

Wir sind nun darangegangen, eine *Mikrobestimmungsmethode* für Gesamtkohlehydrate in Organen und Körpersäften auszuarbeiten und suchten eine Reaktion, die für Kohlehydrate möglichst spezifisch war. Dadurch hofften wir die Ausfällung der Eiweißabbauprodukte und anderer reduzierender Beimischungen, die sich in Organhydrolysaten finden, umgehen und auch auf diese Weise mit viel geringeren Mengen von Material das Auslangen finden zu können.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Kohlehydrate auf Grund einer für sie spezifischen Farbenreaktion zu bestimmen. So haben *Reicher*

---

[1]) *O. Löwi*, Therap. Monatsh. **32**, 1918.

[2]) Die Beseitigung von Eiweißbeimengungen durch die Quecksilberacetatfällung ist zuerst von *C. Neuberg* angegeben worden. *Neuberg*, Der Harn 1911, S. 333; diese Zeitschr. **87**, 142, 1911; ebendaselbst **40**, 498, 1912.

und *Stein*[1]) zu diesem Zwecke die *Molischsche Reaktion* angewendet. Das Verfahren hat den Nachteil, daß durch die beim Vermischen der konzentrierten H_2SO_4 mit der wässerigen Zuckerlösung entstehende Wärme die einzelnen Proben nicht ganz gleich erhitzt werden, wodurch bewirkt wird, daß selbst Lösungen gleicher Konzentration ungleich gefärbt erscheinen. *Leonhard Wacker*[2]) hat die rote Farbe, die die Kohlehydrate mit *p-Phenylsulfosäure* in alkalischer Lösung geben, als Grundlage für eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Blutzuckers benutzt. Diese Farbenreaktion ist nicht spezifisch, denn verschiedene andere Stoffe, wie Alkohol und Aldehyde, geben sie ebenfalls. Auch soll nach *Forschbach* und *Severin*[3]) diese Reaktion durch die Gegenwart von Stoffen, die im Blute neben Zucker in größerer Menge vorkommen, wesentlich beeinflußt werden.

Man kennt nun von den Kohlehydraten eine ganze Reihe von Farbenreaktionen, und wir suchten eine zu finden, die als Grundlage eines einfachen kolorimetrischen Verfahrens dienen könnte. Beim Suchen nach einer geeigneten spezifischen Farbenreaktion der Kohlehydrate, stießen wir auf die Angaben von *Weehuyzen* und *C. Fleig*, daß *die Kohlehydrate, mit Indol und Skatol und konzentrierter HCl und H_2SO_4 erhitzt, eine rotviolette bzw. braune Färbung geben.*

Weehuyzen[4]) fand, daß Glucose, Lactose, Saccharose, Stärke und Cellulose mit *Skatol* und HCl eine violette Farbe geben, mit *Indol* und konzentrierter HCl dagegen eine braune Farbe. *Fleig*[5]) hat die Reaktion der Kohlehydrate mit Indol und HCl bzw. H_2SO_4 näher untersucht. ½ ccm einer Kohlehydratlösung versetzte er mit 2 bis 3 ccm einer konzentrierten HCl-Lösung, erhitzte auf offener Flamme und fügte einige Tropfen einer 1proz. alkoholischen Indollösung hinzu. Auf diese Weise fand er, daß alle Kohlehydrate und Glucoside die Reaktion mit Indol und HCl geben. Er fand auch, daß Glucose mit Indol und H_2SO_4, in derselben Weise erhitzt, eine braune Farbe gibt. Von den Eiweißkörpern geben angeblich nur diejenigen die Reaktion, die mit HCl erhitzt Furfurol liefern.

Wir gingen nun daran, diese Reaktion auf ihre Eignung zu prüfen, als Prinzip einer kolorimetrischen Mikrobestimmungsmethode der Kohlehydrate zu dienen. Wir haben dabei in dem Bereich unserer Untersuchung nicht nur das Verhalten der Glucose bei dieser Reaktion, sondern auch dasjenige anderer Kohlehydrate und komplexer Verbindungen, in deren Molekül Kohlehydrate als Bausteine erscheinen, gezogen. Denn einerseits sind diese Stoffe zum Teil immer, zum Teil zeitweise neben Glucose im tierischen Organismus zu finden und kommen deshalb für die Kohlehydratbestimmung in Organen und im Blute in Betracht; andererseits hofften wir, auf diese Weise Einblick in die Natur der Reaktionen finden zu können.

[1]) *Reicher* und *Stein*, Verhandl. d. Kongr. f. inn. Med. **27**, 401, 1910.
[2]) *L. Wacker*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 197.
[3]) *Forschbach* und *Severin*, Zentralbl. f. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels, N. F., **6**, 54.
[4]) *Weehuyzen*, Zentralbl. 1907, I, S. 134.
[5]) *Fleig*, ebendaselbst 1908, II, S. 1954.

II. Reaktionen der Kohlehydrate mit Skatol und Indol in salzsaurer und schwefelsaurer Lösung.

Bei der Untersuchung dieser Reaktionen gingen wir so vor, daß wir zunächst für jede einzelne die optimalen Bedingungen in bezug auf Dauer des Erhitzens und Konzentration der verwendeten Reagenzien feststellten, dann den Zusammenhang zwischen Konzentration der Glucose und der anderen Kohlehydrate und der Farbstärke der Reaktion prüften, zuletzt den Einfluß nicht kohlehydratartiger Substanzen auf den Ablauf der Reaktion untersuchten.

A. Versuche über die Reaktion der Kohlehydrate mit Skatol und Salzsäure.

Diese wie alle späteren Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß in einer Eprouvette zu 1 ccm der betreffenden Zuckerlösung 9 ccm Säure und außerdem alkoholische Skatol- bzw. Indollösung zugesetzt wurden, und das Gemenge in ein siedendes Wasserbad für eine gewisse Zeit gestellt wurde.

a) Abhängigkeit der Farbstärke der Reaktion von der Zeitdauer des Erhitzens, der Größe des Skatolzusatzes und der Konzentration des Zuckers bei Verwendung von Säure vom spezifischen Gewicht 1,175.

In sechs Eprouvetten wurde je 1 ccm einer 0,1proz. Glucoselösung mit 9 ccm HCl (spezifisches Gewicht 1,175) und 1 ccm einer 0,5proz. alkoholischen Skatollösung (*Merck*, synthetisch) versetzt, nach je 2, 2½, 3, 3½, 4 und 5 Minuten wurde eine Eprouvette aus dem Wasserbad genommen und an der Wasserleitung abgekühlt. Die Intensitäten der Farben der einzelnen Proben wurden dann im Dubosqkolorimeter miteinander verglichen. Die rotviolette Farbe war am stärksten in der Probe, die 3 Minuten im Wasserbad erhitzt wurde. Länger dauerndes Erhitzen bewirkte eine Abschwächung der Farbe.

In einem genau wie oben angesetzten Versuch wurden in die einzelnen Eprouvetten je 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7 und 1,0 ccm einer 1proz. alkoholischen Skatollösung zugefügt und miteinander erhitzt. Die Farbstärke erwies sich schon bei Zusatz von 0,3 ccm als maximal.

Bei der Prüfung des Einflusses der Zuckerkonzentration auf den Farbtiter zeigte sich zunächst, daß die Farbe noch bei Glucoselösungen von einer Konzentration von 0,02 deutlich zu sehen ist. Sie erwies sich als nicht proportional der Konzentration der Glucose, vielmehr stieg sie stärker an, als es der Konzentration entspricht. In Lösungen, die weniger als 0,05 Proz. Glucose enthielten, änderte sich auch der Farbton mit der Konzentration in dem Sinne, daß schwächere Lösungen rötlicher waren als die stärkeren.

b) Reaktion der verschiedenen Kohlehydrate mit Skatol und konzentrierter Salzsäure.

1. *Fructose (Schering)* gibt die Farbenreaktion in viel stärkerem Grade als die Glucose. 1 ccm einer 0,001proz. Fructoselösung zeigt eine deutlich erkennbare violette Färbung; eine 0,002proz. Fructoselösung zeigte ungefähr die gleiche Färbung wie eine 0,036proz. Glucoselösung.

2. *Arabinose (Kahlbaum).* Eine 0,2proz. Arabinoselösung zeigte keine violette, sondern eine braune Farbe.

3. *Glucuronsäure.* Eine 0,1proz. Lösung von Glucuronsäureanhydrid zeigte eine schwache braune Farbe.

4. *Glykogen.* Für die Versuche mit Glykogen verwendeten wir eine 5proz. Glykogenlösung, die in Ampullen zu je 2 ccm in den Handel gebracht wird *(Clin)*. Die Lösung war stark opalisierend und schäumte leicht. Von dieser Lösung stellten wir uns zum Verdünnen eine 0,2proz. Stammlösung her. Da die genaue Konzentration der Stammlösung uns nicht bekannt war, verglichen wir den Farbtiter des Glykogens mit dem der Glucose in der Weise miteinander, daß wir das Glykogen mit einer Salzsäure von 2,2 Proz. durch 2 Stunden auf dem Wasserbad hydrolysierten und das nur mehr Glucose enthaltende Hydrolysat mit der ursprünglichen Glucoselösung verglichen. Es ergab sich, daß der Farbtiter des Glykogens mit demjenigen seines Hydrolysats übereinstimmt.

5. *Nucleinsäuren.* Eine 0,4proz. Lösung des Na-Salzes einer Hefenucleinsäure gab eine starke braune Farbe.

6. *Saccharose.* Eine 0,2proz. Lösung von Saccharose ergab eine sehr dunkle, violette Farbe. Eine 0,004proz. Saccharoselösung zeigte denselben Farbtiter wie eine 0,14proz. Glucoselösung, demnach gibt Saccharose die Reaktion etwa 25mal stärker als Glucose und noch zweimal so stark als ihrem Fructosegehalt entspricht.

7. *Hexosephosphorsäure.* Wir verwendeten als Präparat das „Kandiolin", das neutrale, in H_2O schwer lösliche Ca-Salz der Hexosediphosphorsäure (von *Bayer*). Nach *Neuberg, Färber, Lewite* und *Schwenk* kommt dieser Verbindung die Formel $C_6H_{10}O_4(PO_4Ca)_2 + H_2O$ zu, entsprechend dem Molekulargewicht 434. Wir lösten das Salz in verdünnter Salzsäure. Eine 0,06proz. Lösung von hexosephosphorsaurem Ca ergab eine Farbe, die sich zu der einer 0,04proz. Saccharoselösung wie 15 : 9,4 verhielt; da die Farbe der Saccharoselösung derjenigen einer 0,14proz. Glucoselösung entspricht, so zeigt die Hexosephosphorsäure eine 3½mal so starke Farbe als eine Glucoselösung gleicher Konzentration.

8. *Methylglykosid.* Eine 0,02proz. Lösung zeigt eine braune, kaum wahrnehmbare Farbe.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die violette Farbe mit Skatol und konzentrierter HCl eine für alle *Hexosen* charakteristische Reaktion ist. *Dabei zeigen die Fructose und die komplexen Verbindungen, in der sie enthalten ist, eine weit stärkere Farbe als die Glucose.* Das *Glykogen* gibt die Reaktion so, als ob die in ihm enthaltenen Glucosemoleküle *vollkommen frei wären* und als solche reagierten. Die von einer Zuckerlösung von bestimmter Konzentration erhaltene Farbe ist nicht immer gleich bei Proben gleicher Konzentration desselben Zuckers. Es kommen vielmehr Schwankungen bis 12 Proz. vor. Dies

ist darauf zurückzuführen, daß aus der konzentrierten HCl beim Erhitzen in dem Wasserbad Chlorwasserstoffgas entweicht. Dieses Entweichen findet in zugleich erhitzten Proben nicht immer in gleicher Zeit und Intensität statt, was bewirkt, daß die Konzentration der Säure, die für die Farbstärke wesentlich ist, in den einzelnen Proben verschieden werden kann.

c) Reaktion der Kohlehydrate mit Skatol bei Verwendung verdünnter HCl.

Die Verwendung verdünnter HCl versprach den Vorteil, daß während der Reaktion kein Chlorwasserstoffgas entweichen würde, wodurch die Schwankungen des Farbtiters bei Lösungen gleicher Konzentration ausbleiben würden. Es zeigt sich das bemerkenswerte Resultat, daß unter den Kohlehydraten bei starker Verdünnung *nur die Fructose und Verbindungen, in deren Molekül sie enthalten ist,* eine deutliche Farbenreaktion geben, wenn man eine Säure verwendet, die man durch Vermischen eines Volumens konzentrierter HCl und eines Volumens Wasser erhält. Außer der Fructose geben auch ihre Verbindungen Saccharose und Hexosephosphorsäure eine violette Farbe. Dextrose gibt erst bei Verwendung einer 1proz. Lösung eine schwache violette Farbe. Es geben dagegen noch Lösungen von 0,008proz. Fructose eine deutliche violette Farbe. Die Saccharose reagiert etwas schwächer als die Fructose. Eine Lösung von 0,016 proz. Saccharose zeigt einen Farbtiter wie eine 0,012proz. Fructoselösung, also noch immer um 50 Proz. mehr als ihrem Fructosegehalt entspricht. Eine 0,06proz. Lösung von hexosephosphorsaurem Ca zeigt eine schwächere Farbe als eine 0,012proz. Fructoselösung. Arabinose, Glucuronsäure usw. reagieren überhaupt nicht. Beim Erkalten des Reaktionsgemischs tritt eine Trübung ein. Beim Schütteln des erkalteten Reaktionsgemisches mit *Amylalkohol* geht der Farbstoff quantitativ in diesen über, wodurch eine klare, dunkelblauviolette Lösung entsteht, die beim Stehen immer dunkler wird. Eine Kontrollprobe, in der neben Skatol und HCl kein Zucker vorhanden war, zeigte eine schwachbraune Farbe. Aus alledem ergibt sich, daß beim Verdünnen der zur Reaktion des Skatols verwendeten HCl das Verhältnis der Farbstärken Fructose zu Glucose sich *sehr stark zugunsten der Fructose verschiebt,* denn während bei der konzentrierten HCl dieses Verhältnis 1 : 18 war, ist es bei der verdünnten wie 1 : 200. *Man kann also diese Reaktion zum Nachweis der Fructose und ihrer Verbindungen benutzen in Lösungen, in denen nicht die Konzentration einer etwa gleichzeitig vorhandenen Dextrose einige Zehntel Prozent übersteigt.* So ist auch der positive Ausfall der Reaktion mit Skatol und verdünnter Salzsäure bei der *Hexosephosphorsäure* ein neuer Hinweis darauf, daß Lävulose das in dieser Verbindung enthaltene Kohlehydrat ist.

Da sich nun die Reaktion mit *Skatol* und HCl als nicht proportional dem Zuckergehalt erwies, gingen wir daran, die Reaktion des *Indols* mit HCl zu prüfen.

B. Reaktionen der Kohlehydrate mit Indol und Salzsäure.

a) Bei Verwendung konzentrierter Säure vom spezifischen Gewicht 1,175.

Dieselben Versuche, wie sie mit Glucoselösungen und Skatol in bezug auf die Abhängigkeit der Farbenintensität der Reaktion von der Dauer des Erhitzens und der optimalen Menge der zugesetzten Reagenzien angestellt worden waren, wurden mit Indol wiederholt. Das Indol allein, ohne Zuckerzusatz, gibt, in der Kälte mit konzentrierter HCl versetzt, einen gelblichgrünen Farbton, der nach Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad in Braun umschlägt. Die Intensität der Indoleigenfarbe ist jedoch so schwach, daß sie nur bei sehr großen Verdünnungen der Kohlehydrate schaden könnte. Wird die Reaktion mit Glucose angesetzt, so resultiert eine schöne mahagonibraune Farbe, die noch bei Anwesenheit von 0,01 proz. Glucose gut kolorimetrierbar ist.

1. Abhängigkeit der Reaktion von der Dauer des Erhitzens und der Konzentration der verwendeten Reagenzien.

Betreffs der Abhängigkeit der Intensität der Farbenreaktion von der Dauer des Erhitzens, verhielt sich diese Reaktion ganz anders als diejenige des Skatols. Die Farbintensität ist *um so stärker, je länger erhitzt wird.* Nach mehr als 10 Minuten dauerndem Erhitzen tritt aber oft, besonders in konzentrierten Lösungen, eine *Trübung* auf, die das Kolorimetrieren unmöglich macht. Bezüglich der Abhängigkeit der Farbintensität von der Menge der zugesetzten Indollösung stellten wir fest, daß in der beschriebenen Versuchsanordnung bei Zusatz von 0,25 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung das Maximum der Farbe erreicht war. Bei geringerem Zusatz als 0,25 ccm war die Farbintensität geringer, bei höherem Zusatz verstärkte sie sich nicht mehr. Wir prüften sodann noch den Einfluß der *Säurekonzentration* auf die Farbintensität und überzeugten uns, daß mit wachsender Verdünnung der Säure die Intensität der Reaktion sinkt. Nachdem wir so die optimalen Bedingungen der Reaktion in bezug auf die Dauer des Erhitzens, die Größe des Indolzusatzes festgestellt haben, untersuchten wir das Verhältnis zwischen Konzentration des Kohlehydrats und der gebildeten Farbe.

2. Abhängigkeit der Farbe von der Kohlehydratkonzentration.

Die Reaktion erwies sich im großen und ganzen in einem Bereich von 0,01 bis 0,2 Proz. dem Zuckergehalt annähernd proportional. Trotzdem würde sie sich als Grundlage einer kolorimetrischen Methode nicht eignen, da Schwankungen bis zu 12 Proz. bei Lösungen derselben Konzentration vorkommen. Dies dürfte auf dieselbe Ursache zurück-

zuführen sein, wie die Schwankungen bei Verwendungen von Skatol, nämlich auf das Entweichen von Chlorwasserstoffgas aus der konzentrierten Salzsäure im siedenden Wasser. Deshalb haben wir, wie mit Skatol, so auch mit Indol Versuche unter Verwendung der 20proz. Salzsäure angestellt, die kein Chlorwasserstoffgas bei 100° mehr entweichen läßt.

Zu bemerken ist, daß *Fructose die Reaktionen etwa dreimal so stark als Glucose gibt*, die Farbe ist dabei nicht mahagonibraun, sondern rotbraun. *Beim Erhitzen tritt sie viel früher auf*, schon in der ersten Minute des Erhitzens, so daß der Unterschied der Farben gleichkonzentrierter Glucose- und Fructoselösungen in der ersten und zweiten Minute viel größer ist als nach 10 Minuten.

b) Verwendung von 10- und 20proz. Salzsäure.

Die Glucose gibt beim Erhitzen mit Indol und 20proz. HCl in Lösungen, deren Konzentration unter 0,1 Proz. liegt, einen nur kaum wahrnehmbaren braunen Farbton. Erst bei Lösungen von einigen Zehntelprozent tritt eine deutliche, wenn auch schwachbraune Farbe auf. Die *Fructose* und die *Saccharose* dagegen geben schon in Lösungen, deren Konzentration unter 0,01 liegt, eine schöne goldbraune Farbe. Geht man mit der Konzentration der HCl noch weiter, etwa auf 10 Proz. hinunter, so ändert sich das Bild abermals. Die Glucose gibt überhaupt keine deutliche Reaktion mehr, die Fructose und Saccharose dagegen geben noch in Konzentrationen von 0,005 Proz. eine rosa Farbe, die in deutliches Rot übergeht, wenn die Konzentration der Fructose 0,2 Proz. erreicht. Dabei wird das Maximum der Farbstärke nach 4 Minuten langem Erhitzen erreicht. Nach dem Erkalten des gefärbten Reaktionsgemisches trübt sich die Lösung.

Die Farbe kann man in Amylalkohol aufnehmen, der sich dabei braunrot färbt; setzt man eine Kontrollprobe ohne Fructosezusatz an und schüttelt nach Erhitzen und nachherigem Erkalten mit Amylalkohol aus, so färbt sich der Amylalkohol schwach gelb.

Die Reaktionen, die mit HCl und Indol angesetzt wurden, erweisen sich also als nicht geeignet für eine kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Kohlehydrate, da bei Verwendung konzentrierter Säure Lösungen derselben Konzentration stark voneinander abweichende Farbwerte liefern, beim Verdünnen der Säure aber die Reaktion mit verdünnten Glucoselösungen zu schwach wird, bei Fructoselösungen jedoch sich trübt.

Um diesen Störungen auszuweichen, haben wir die Reaktion statt mit HCl mit H_2SO_4 anzusetzen versucht.

C. Reaktion der Kohlehydrate mit Indol bei Verwendung verschieden konzentrierter Schwefelsäure.

a) Versuche mit Glucose.

1. Versuche über den Einfluß der Säurekonzentration.

Wir stellten verschiedene Konzentrationen der Schwefelsäurelösung in der Weise her, daß wir je 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 60, 50 ccm einer H_2SO_4 vom spezifischen Gewicht 1,85 mit destilliertem Wasser auf 100 ccm auffüllten. Je 1 ccm einer 0,025proz. Dextroselösung wurde mit je 9 ccm Schwefelsäure dieser Konzentrationsreihe und mit 0,5 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung versetzt. Diese Lösungen wurden in gewohnter Weise 10 Minuten in dem siedenden Wasserbad erhitzt. Diejenigen Proben, die mit einer Schwefelsäure versetzt waren, deren Konzentration stärker war als 75 Vol.-Proz. H_2SO_4, hatten eine rotbraune Farbe, die sich im Ton von der mit Indol und HCl gelieferten wesentlich unterschied.

Bei den Proben, bei denen eine schwächere Schwefelsäure als 75 Vol.-Proz. verwendet wurde, trat eine rein braune Farbe ein. Abgesehen von diesem Unterschied im Farbton, nahm mit steigender Konzentration der Säure die Intensität der Farbe zu, wie folgende Zahlen zeigen:

Tabelle I.

Verhältnis von Farbstärken derselben Glucoselösung bei verschieden konzentrierter Schwefelsäure. (Prozente entsprechen Vol.-Proz. der H_2SO_4 vom spezifischen Gewicht 1,84.)

100 : 95 Proz.	= 20 : 17,6	80 : 75 Proz.	= 20 : 16,4
95 : 90 „	= 20 : 18,1	75 : 70 „	= 20 : 17,2
90 : 85 „	= 20 : 16,9	70 : 60 „	= 20 : 13,2
85 : 80 „	= 20 : 17	60 : 50 „	= 20 : 12,8

Es scheint also, daß bei Verwendung der ganz konzentrierten H_2SO_4 zwei verschiedene chemische Prozesse stattfinden, von denen der eine zu einem *braungefärbten*, der andere zu einem *rotgefärbten* Produkt führt. Da also den verschiedenen Säurekonzentrationen zwei verschiedene Farbenreaktionen und verschiedene Farbintensitäten entsprechen, mußte zunächst entschieden werden, mit welcher Säurekonzentration weiterhin gearbeitet werden soll. Schon die ersten Versuche zeigten, daß die Verwendung der konzentrierten Säure nicht zweckmäßig ist, denn die rotbraune Farbe, die bei Verwendung der höheren Säurekonzentration auftritt, verhielt sich in der Weise, daß beim Vergleich zweier verschieden starker Zuckerlösungen die konzentrierte Lösung nicht nur eine stärkere Farbe, sondern auch einen mehr roten Farbton als die schwächere Lösung zeigte. Dadurch war der kolorimetrische Vergleich dieser Lösungen sehr erschwert. Bei Verwendung von Säuren jedoch, die weniger als 75 Vol.-Proz. H_2SO_4 enthielten, haben sich die Farbtöne verschiedener Zuckerlösungen zwar quantitativ verschieden, qualitativ aber vollständig gleich verhalten, wodurch eine scharfe Einstellung im Kolorimeter möglich war. Von denjenigen Zuckerkonzentrationen, die keinen roten Farbton mehr aufwiesen, war die Farbintensität bei der 75vol.-proz. Säure am stärksten. Noch beträchtlich stärker war die Farbintensität bei Verwendung einer 77,5vol.-proz. H_2SO_4, die jedoch noch immer einen reinen braunen Farbton erzeugte.

Diese Konzentration der Säure von 77,5 Vol.-Proz. empfiehlt sich daher als die geeignetste zur Ansetzung der Zuckerindolreaktion und wurde in allen folgenden Versuchen verwendet.

Da wir immer 1 ccm der Glucoselösung mit 9 ccm dieser Säure versetzten, war die Konzentration H_2SO_4 in dem Reaktionsgemisch etwa *70 Vol.-Proz. Alle weiteren Versuche wurden also in der Weise angesetzt, daß sich diese Schlußkonzentration ergab.*

Es erwies sich dabei als belanglos, auf welchem Wege man zu dieser Schlußkonzentration der H_2SO_4 gelangt. Man kann also, statt 1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 9 ccm 77,5 vol.-proz. H_2SO_4 zu versetzen, die Säure in der Weise verdünnen, daß man z. B. zu 3½ ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit unter starker Kühlung 7 ccm konzentrierter H_2SO_4 vom spezifischen Gewicht 1,84 hinzufügt, wobei infolge der stattfindenden Kontraktion die Flüssigkeit nach vollkommener Abkühlung ein Volumen von 10 ccm einnimmt. Es ist aber vorteilhafter, wo es nur angeht, 1 ccm der wässerigen Lösung mit 77,5 vol.-proz. H_2SO_4 auf 10 ccm aufzufüllen, da dabei keine Reaktionswärme auftritt, und das scharfe Abkühlen fortfallen kann, das beim anderen Verfahren unbedingt notwendig ist.

2. Einfluß der Dauer des Erhitzens.

Es wurden acht Proben zu je 1 ccm einer 0,02proz. Glucoselösung mit 9 ccm 77,5 vol.-proz. H_2SO_4 und 0,3 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung versetzt und 3 bis 20 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. In der folgenden Tabelle bedeuten die Zahlen in der zweiten Rubrik die Intensität der betreffenden Farblösungen, bezogen auf die Lösung 1 als Einheit.

Tabelle II.

Lösung	Dauer des Erhitzens Min.	Vervielfachung der Farbstärke gegenüber Lösung 1	Lösung	Dauer des Erhitzens Min.	Vervielfachung der Farbstärke gegenüber Lösung 1
1	3	—	5	10	3,4
2	5	1,9	6	12	3,6
3	7	2,6	7	15	4,0
4	9	3,3	8	20	4,2

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, daß die Intensität der Farblösung mit der Dauer des Erhitzens bis 20 Minuten ansteigt. Bei Lösungen stärkerer Konzentration treten jedoch nach 15 Minuten Trübungen auf. Aus diesem Grunde und um die Dauer der Bestimmung möglichst abzukürzen, erhitzten wir nun in unseren Versuchen nur 10 Minuten.

3. Einfluß der Größe des Indolzusatzes.

Neun Proben zu je 1 ccm einer 0,025proz. Glucoselösung wurden mit 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 bis 1 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung

versetzt und 10 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und danach ihre Farbintensität kolorimetrisch verglichen.

Es zeigt sich, daß die mit 0,2 ccm versetzte Probe eine stärkere Farbe ergab, als die mit 0,05 und 0,1 ccm versetzten Lösungen, alle übrigen ergeben die gleiche Intensität wie die mit 0,2 ccm hergestellten Reaktionen. Wir verwendeten also in unseren weiteren Versuchen *0,3 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung*, um von kleineren Unregelmäßigkeiten des Indolzusatzes sicher unabhängig zu sein.

1 ccm H_2O mit 77,5vol.-proz. H_2SO_4 auf 10 ccm aufgefüllt und mit 0,3 ccm der alkoholischen Indollösung versetzt, gibt in der Kälte eine grüngelbe *Nebenfarbe*, die beim Erwärmen verschwindet. Wird das Erwärmen 10 Minuten fortgesetzt, verbleibt eine kaum wahrnehmbare, leicht braune Tönung, wofern man die Reaktion ganz genau nach der Vorschrift angesetzt hat. Bei nicht ganz korrektem Ansatz tritt oft doch eine etwas stärkere Farbe auf, die dann einen quantitativen Vergleich stören könnte.

4. Einfluß der Glucosekonzentration.

Wir haben den Einfluß der Zuckerkonzentration untersucht bei Lösungen, deren Glucosegehalt zwischen 0,1 und 0,002 Proz. schwankte. Bei Lösungen über 0,1 Proz. ist die Kolorimetrie erschwert, weil der Farbton zu dunkel ist. Der für die Kolorimetrie günstigste Farbenbereich liegt zwischen 0,015 und 0,050proz. Glucose.

Es wurde in diesen Versuchen 1 ccm der wässerigen Glucoselösung mit 9 ccm 77,5vol.-proz. H_2SO_4 und 0,3 ccm 1proz. Indollösung versetzt und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. In dieser Art wurden Lösungen verschiedener Glucosekonzentration serienweise miteinander verglichen. Um ein gleichmäßiges Erhitzen der einzelnen Proben zu erreichen, waren die für den Versuch benutzten Eprouvetten von gleichem Durchmesser. Der Wasserspiegel des Wasserbades war so hoch, daß die Flüssigkeit in den Eprouvetten vollkommen eintauchte. Wir benutzten ein Wasserbad mit Einsatz für Eprouvetten, so daß alle Proben zu gleicher Zeit in das Wasserbad hinein- und hinausgelangten. Der Einsatz des Wasserbades war so gebaut, daß die Eprouvetten den Boden des Topfes nicht berührten. Von der großen Zahl von Versuchen, die wir in dieser Art machten, teilen wir einige in der nachstehenden Tabelle III mit. In jeder Serie wurde die mittlere Glucosekonzentration als Standard benutzt.

Die Zahlen der Tabelle III geben den Glucosegehalt der untersuchten Lösungen in Prozenten an. Die Zahl der ersten Reihe jeder Serie bedeutet den theoretischen, eingewogenen Wert, die der zweiten den kolorimetrisch ermittelten bei Annahme einer vollkommenen Pro-

portionalität zwischen Farbstärke und Konzentration, die der dritten den kolorimetrisch ermittelten bei Berücksichtigung der unten angegebenen Korrektur.

Tabelle III.

0,005 0,0053 0,0049	0,006 0,0063 0,0059	0,007 0,0072 0,0070	0,008 St.	0,009 0,0087 0,0089	0,010 0,0094 0,0097
0,010 0,0105 0,0099	0,012 0,0124 0,012	0,014 St.	0,016 0,0159 0,0164	0,018 0,0171 0,0179	0,020 0,019 0,020
0,020 0,0216 0,0199	0,024 0,0257 0,0245	0,028 0,0286 0,0278	0,032 St.	0,036 0,0353 0,0361	0,040 0,039 0,0408
0,040 0,0418 0,0393	0,048 0,0502 0,0489	0,056 St.	0,064 0,0625 0,0641	0,072 0,068 0,071	0,080 0,0759 0,0809
0,050 0,0532 0,0494	0,060 0,0642 0,0161	0,070 0,0719 0,0701	0,080 St.	0,090 0,0888 0,091	0,100 0,0957 0,0984

0,005 0,0056	0,010 St.	0,020 0,018
0,020 0,0222	0,040 St.	0,080 0,072

Es zeigt sich also, daß die Farbintensität der Reaktion in dem ganzen untersuchten Bereich der Glucosekonzentration der betreffenden Probe annähernd proportional war. Die Abweichungen von der Proportionalität waren in dem ganzen Bereich von 0,005 bis 0,1 Proz. Glucosekonzentration ganz regelmäßig, und es konnte ihr in sehr einfacher Weise Rechnung getragen werden.

Beim Vergleich nämlich einer Lösung A mit einer doppelt, also um 100 Proz. stärker konzentrierten Lösung B war die Farbstärke der Lösung A in dem ganzen Bereich immer um 20 Proz. schwächer, als es dem Proportionalitätsverhältnis entsprechen würde. Betrug aber die Differenz der Konzentration zwischen A und B nur einen bestimmten Bruchteil von 100 Proz., so war die Abweichung vom Proportionalitätsverhältnis entsprechend kleiner, war z. B. die *Konzentration* von B um 50 Proz. stärker als die von A, so war die *Farbstärke* von B nicht um 50 Proz. größer als diejenige von A, sondern im Mittel um 50 — 10 = 40 Proz. War aber B um 100 Proz. stärker als A, so war die Farbstärke von B nicht um 100, sondern im Mittel um 100 — 20 = 80 Proz. stärker als A. Diese Gesetzmäßigkeit konnten wir durch eine große Zahl von Versuchen empirisch feststellen. Bei einem Unterschied von

100 Proz. zwischen Standardlösung und der zu untersuchenden Lösung bedingt diese Abweichung von der Proportionalität in *absoluten* Werten einen Fehler von ungefähr 10 Proz., wie aus Tabelle III ersichtlich. Bei einem geringeren Unterschied zwischen Standardlösung und der zu untersuchenden Lösung ist der Fehler natürlich entsprechend kleiner. Man muß daher, will man diese Farbenreaktion als kolorimetrische Bestimmungsmethode verwenden, eine einfache Korrektur in dem oben angedeuteten Sinne vornehmen, um aus dem kolorimetrisch ermittelten Verhältnis der Farbstärken der beiden Lösungen auf das tatsächliche Verhältnis der Kohlehydratkonzentrationen schließen zu können.

Sei b zu a nämlich das kolorimetrisch gefundene Verhältnis der Farbstärken der beiden Lösungen, wobei b die stärkere Lösung darstellt (ohne Rücksicht darauf, welche von beiden die Standardlösung sei), so ist nach den Gesetzen der Zinsenrechnung von diesem Verhältnis 0,2 abzuziehen und die dadurch gefundene Zahl durch 0,8 zu dividieren, um dadurch das tatsächliche Verhältnis (b/a) der Kohlehydratkonzentrationen der beiden Lösungen zu finden.

$$\text{Das tatsächliche } \frac{b}{a} = \frac{b/a \text{ (kolorimetrisch gefunden)} - 0{,}2}{0{,}8}$$

Beispiel siehe Vorschrift für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen.

In Tabelle III entsprechen die Zahlen der dritten Reihe jeder Serie den Werten, die man findet, wenn man die kolorimetrisch gefundenen Werte (die Zahlen der zweiten Reihe) in der eben angegebenen Weise korrigiert.

Bei Lösungen mit geringerem Zuckergehalt als 0,005 Proz. wird die Abweichung von der Proportionalität viel stärker. Diese Störung nimmt mit der weiteren Abnahme der Zuckerkonzentration rasch zu. *0,005proz. Glucoselösungen sind also in dieser Versuchsanordnung die unteren Grenzen* der Konzentration, bis zu der man den Zuckergehalt der Lösungen in einfacher Weise durch den Vergleich im Kolorimeter bestimmen könnte.

Wollte man aber Zucker in noch kleineren Konzentrationen bestimmen, so müßte man in der Weise verfahren, daß man mehr als 1 ccm Flüssigkeit, z. B. wie oben angegeben, 3½ ccm verwendet und mit einer konzentrierteren Säure als der 77,5vol.-proz. H_2SO_4 die Schlußkonzentration von 70 Vol.-Proz. herstellt. Auf diese Weise kann man noch den Zuckergehalt von Lösungen bestimmen, die bis 0,0015 Proz. Glucose enthalten. Es läßt sich also noch 0,05 mg Glucose kolorimetrisch bestimmen.

Diese Versuche zeigen, daß die Reaktion der Glucose mit 77,5 Proz. H_2SO_4 und Indol die besten Aussichten für die Ausarbeitung einer kolorimetrischen Kohlehydratmikrobestimmungsmethode bietet.

5. Versuche über die Haltbarkeit des Farbstoffs.

Die einmal gebildete Farbe ist, sich selbst überlassen, sehr konstant und ändert sich selbst nach tagelangem Stehen nicht in ihrer Intensität.

Bei der *Verdünnung mit H_2O* dagegen nimmt der Farbtiter stärker ab, als es der Verdünnung entspricht, der Farbstoff ist somit *wasserempfindlich*. Gießt man etwas von der fertigen Farblösung in viel Wasser und läßt es einige Stunden stehen, dann wird die Lösung vollständig entfärbt, und der Farbstoff setzt sich in Form von voluminösen, braunroten Flocken am Boden des Gefäßes ab.

Verdünnt man die schon bei der Reaktion gebildete Farblösung *mit einer 70vol.-proz. H_2SO_4*, mit der auch die Reaktion angesetzt worden war, so zeigt sich, daß die Farbe streng proportional mit der Verdünnung abnimmt.

Der Farbstoff geht nach Verdünnung mit der gleichen Menge Wasser beim Schütteln mit der gleichen Menge *Amylalkohol* in diesen restlos über. Während aber beim Stehen in der ursprünglichen Lösung der Farbstoff auch nach 24 Stunden seine Intensität nicht ändert, wird seine Lösung in Amylalkohol schon nach kurzer Zeit viel dunkler. Stellt man die Reaktion mit sehr verschiedenen Zuckerlösungen an und extrahiert den Farbstoff aus jeder Probe mit derselben Menge Amylalkohol, so erscheinen die einzelnen Proben der amylalkoholischen Lösung nach mehrstündigem Stehen viel weniger verschieden, als es dem Verhältnis der Glucosekonzentration der Lösungen, aus denen sie gewonnen wurden, entsprechen würde.

b) Verhalten anderer Kohlehydrate.

Sämtliche folgenden Substanzen wurden (bis auf Hexosephosphorsäure) im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1. *Galaktose.* Eine Lösung von 0,02proz. Galaktose verhält sich zu einer gleichkonzentrierten Glucoselösung wie 20 : 20,8. Man kann somit den Farbtiter von Dextrose und Glucose als ungefähr gleich betrachten, da der Fehler von 4 Proz. in die Fehlerbreite fällt.

2. *Fructose* (Präparat *Schering*). Es wurde eine 0,024-, 0,020- und 0,012proz. Lösung von Fructose mit einer ebenso konzentrierten Lösung von Dextrose verglichen. 0,024proz. Fructose verhält sich zu einer gleichen Glucoselösung wie 15 : 13,1, eine 0,020proz. Fructoselösung zu Glucose wie 15 : 13,4, eine 0,012proz. Fructose verhält sich zu einer gleichen Glucose wie 15 : 13,2. *Es gibt also die Fructose eine im Mittel um 12 Proz. stärkere Farbe als die gleichkonzentrierte Glucoselösung.*

Dabei ist zu bemerken, daß in den mit Fructose angesetzten Proben die braune Farbe schon in der ersten Minute des Erhitzens auftritt, wo die Temperatur etwa bis zu 70° gestiegen ist. Hexosephosphorsaures Ca und Saccharose verhalten sich in bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens der braunen Farbe ebenso. Dagegen beginnt die Färbung der Glucose erst am Ende der dritten Minute des Erhitzens sich bemerkbar zu machen. Die Temperatur hat in diesem Zeitpunkt 100° bereits erreicht.

3. *Di- und Polysaccharide.* Es wurden untersucht: Lactose, Maltose, Saccharose, *Merck*sches Dextrin, lösliche Stärke und Glykogen von *Schuchardt*. Es wurde dabei so vorgegangen, daß 10 ccm einer Lösung von 0,05 Proz. dieser Substanzen mit 2,75 ccm 10proz. HCl versetzt wurden, so daß die Gesamtkonzentration an HCl jetzt 2,2 Proz. war. Diese Lösung wurde durch 3 Stunden auf dem Wasserbad bei 100° hydrolysiert. Sodann wurde die Lösung in ein Meßkölbchen von 20 ccm übergespült und aufgefüllt. Diese Lösungen, die gegenüber den Ausgangslösungen auf das Doppelte verdünnt waren, wurden nun kolorimetrisch mit 0,025proz., nicht hydrolysierten Lösungen derselben Stoffe verglichen. Die Tabelle IV zeigt die Werte.

Tabelle IV.

Substanz	Wert vor der Hydrolyse Proz.	Wert nach der Hydrolyse Proz.	Substanz	Wert vor der Hydrolyse Proz.	Wert nach der Hydrolyse Proz.
Lactose . .	0,025	0,0247	Dextrin . .	0,025	0,0251
Maltose . .	0,025	0,0246	Stärke . .	0,025	0,0252
Saccharose	0,025	0,0255	Glykogen .	0,025	0,0249

Es ergibt sich somit das wichtige Resultat, daß *hydrolysierbare komplexe Kohlehydrate nach einer dreistündigen Hydrolyse mit verdünnter HCl mit Indol und H_2SO_4 dieselbe Farbstärke wie vor der Hydrolyse geben.* Durch eine derartige Hydrolyse werden nun komplexe Kohlehydrate zur Gänze in Monosaccharide umgewandelt. Das kann entweder darauf beruhen, daß die komplexen Kohlehydrate schon in der ersten Minute des Erhitzens mit der 70vol.-proz. H_2SO_4 in Glucose gespalten werden, oder daß die zu einem Molekül verketteten Monosaccharide mit Indol und H_2SO_4 genau so reagieren, als ob sie frei wären.

Da bereits verhältnismäßig geringfügige Veränderungen am Glucosemolekül, wie z. B. der Ersatz einer Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe wie im Glucosamin oder eine Oxydation in einem endständigen C-Atom, wie bei den Glucuronsäuren oder der Gluconsäure schon sehr wesentliche Veränderungen der Farbintensität der Reaktion bewirken, so müßte man in dem letzteren Falle annehmen, daß das Zusammentreffen mehrerer Hexosemoleküle zu einem Polysaccharid gerade diejenigen Atomgruppierungen unberührt läßt, die für das Zustandekommen dieser Reaktion maßgebend sind. Es besitzen somit alle Di- und Polysaccharide, die nur Glucose oder Galaktose enthalten, denselben Farbtiter wie eine entsprechende Menge Glucose. Die Saccharose hingegen gibt entsprechend ihrem Fructosegehalt einen etwas höheren Wert, ungefähr um 6 Proz.

Für die Bestimmung der Kohlehydrate in Körpersäften ist diese Tatsache von entscheidender Bedeutung, denn sie ermöglicht es, *Glykogen zusammen mit der Glucose ohne vorherige Hydrolyse des ersteren* mit verdünnter Mineralsäure, wie sie bisher notwendig war, durch Vergleich mit einem Traubenzuckerstandard nebeneinander zu bestimmen.

4. *Pentosen.* Es wurde nur Arabinose untersucht, da uns keine anderen Pentosen zur Verfügung standen. Da aber die Galaktose sich genau so verhält wie die Glucose, so ist anzunehmen, daß auch Xylose und Ribose sich nicht anders verhalten wie Arabinose, da sie sich bloß sterisch von dieser unterscheiden. Die Arabinose gibt eine Farbe, die sich von der Farbe, die man bei Verwendung der Hexosen erhält, durch einen gelben Stich des braunen Farbtones unterscheidet, während die Hexosen eine rein braune Farbe liefern. Die Farbe ist in Lösungen von über 0,05 Proz. Arabinose der Konzentration annähernd proportional, in schwächeren Lösungen nimmt die Farbe weniger stark ab, als dem Gehalt an Arabinose entspricht.

c) Verhalten von Substanzen, die durch geringe Änderungen des Zuckermoleküls aus diesem gebildet werden.

Wir untersuchten nun auch noch eine Reihe von Körpern, die entweder von den Hexosen abstammen oder Hexosen im Verbande ihres Moleküls enthalten. Wir wollten uns zunächst Klarheit darüber verschaffen, welchen Einfluß Änderungen an gewissen Atomgruppen des Hexosemoleküls auf die Farbstärke der Reaktion besitzen. Außerdem waren diese Untersuchungen für uns auch vor allem deshalb von Interesse, weil einige dieser Körper in Organen und Körpersäften enthalten sind und möglicherweise die Bestimmung der Kohlehydrate in Organen und Körpersäften stören könnten. Endlich wollten wir feststellen, ob es nicht mit Hilfe der Indol-H_2SO_4-Reaktion möglich wäre, die in einem komplexen Molekül, z. B. Nucleinsäuren und Eiweißstoffen enthaltenen Kohlehydrate quantitativ bestimmen zu können. Deshalb untersuchten wir diese Stoffe nicht nur für sich allein, sondern auch in Mischungen mit Glucose. Wir prüften Gluconsäure, Schleimsäure, Glucuronsäureanhydrid, Glucosaminchlorhydrat, Chitosanchlorhydrat, chondroitinschwefelsaures Na, Methylglucosid, Hexosediphosphorsäure, Ovalbumin, Seralbumin, hefenucleinsaures Na und eine tierische Nucleinsäure.

1. *Gluconsäure.* Als Präparat verwendeten wir gluconsaures Ca, das im hiesigen Institut dargestellt worden ist. Eine 0,02proz. Lösung von gluconsaurem Ca gibt einen kaum sichtbaren Farbton, der sich nur um eine Spur von der Indoleigenfarbe unterscheidet. Eine 0,4proz. Lösung gibt eine gelbbraune Farbe, die mit der Zuckerfarbe nur schwer verglichen werden kann und in ihrer Intensität ungefähr einer 0,01proz. Zuckerlösung entspricht.

2. *Schleimsäure.* Verhält sich wie Gluconsäure.

3. *Glucuronsäureanhydrid.* Das Präparat verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Geh.-Rats Prof. *Hans Horst Meyer* vom Wiener phar-

makologischen Institut. Zuerst wurde die Proportionalität festgestellt; eine 0,1proz. Lösung verhielt sich zu einer 0,066proz. wie 20 : 13,5 (statt 13,3), zu einer 0,05proz. Lösung wie 20 : 10. Die Farbintensität der Glucuronsäurefarbe ist ihrer Konzentration proportional. Eine 50 mg-proz. Glucuronsäurelösung verhielt sich zu einem 0,02proz. Zuckerstandard wie 18,2 : 20. Sie entspricht somit einem Wert von 18,2mg-proz. Glucose. Das Präparat gibt also eine Farbe, die nur 36 Proz. der Farbe einer gleichstarken Glucose entspricht. Es wurde nun auch untersucht, ob die Glucuronsäurefarbe auch in einer Lösung voll erscheine, in der neben Glucuronsäure auch Glucose ist. Eine Lösung, die in 100 ccm 17,3 mg Glucose und 33,3 mg Glucuronsäureanhydrid enthielt, gab eine Farbe entsprechend 0,029proz. Glucose. Es ist dies somit der volle theoretische Wert. Glucuronsäure reagiert also wie die Hexosen, nur gibt sie einen bedeutend geringeren Farbtiter.

4. *Glucosaminchlorhydrat* (Präparat *Kahlbaum*). Eine 0,02proz. Lösung gibt fast keine Farbe. Eine 0,5proz. Lösung gibt eine deutliche Färbung, sie verhält sich zu einem Zuckerstandard von 0,024 Proz. wie 10 : 19,6, sie entspricht somit einem Wert von 0,012proz. Glucose. Glucosamin hat also einen Farbtiter, der 40mal kleiner ist als der Titer einer gleichen Menge Glucose. Befindet sich das Glucosamin zusammen mit Glucose in Lösung, so wird ein beträchtlicher Teil der Glucosaminfarbe durch die Gegenwart von Glucose ausgelöscht. Glucosamin reagiert also hier ganz anders als die Hexosen.

5. *Chitosanchlorhydrat* (Präparat des Instituts). Eine 0,2proz. Lösung gibt eine kaum wahrnehmbare Farbe. Die Gegenwart von 0,08proz. Chitosan in einer Glucoselösung von 0,01 Proz. ist für die Stärke der Glucose ohne jede Bedeutung, sie wird vielmehr vollkommen ausgelöscht.

6. *Chondroitinschwefelsaures Natron* (Präparat des Instituts) in heißem Wasser gelöst. Eine 0,075proz. Lösung verhält sich zu einer 0,022proz. Dextroselösung wie 13 : 20; sie entspricht also 0,014proz. Glucose. Das Präparat gibt somit einen Farbwert, als ob es etwa 20 Proz. Glucose enthalten würde.

7. *Methylglucosid.* Eine Methylglucosidlösung gibt 96,4 Proz. der Färbung einer gleichkonzentrierten Glucoselösung. Da das Molekulargewicht der Glucose zu dem des Methylglucosids sich wie 96,4 : 100 verhält, so zeigt sich, daß ein Molekül Methylglucosid genau dieselbe Farbe gibt wie ein Molekül Hexose.

8. *Hexosediphosphorsaures Ca.* Verwendet wurde das Kandiolin von *Bayer*. Das Salz wurde in 2 Proz. HCl gelöst. Eine 0,06proz. Lösung verhielt sich zu einer 0,024proz. Glucoselösung wie 15 : 14,5; eine 0,030proz. Lösung verhielt sich zu einer 0,012proz. Glucoselösung wie 20 : 19,1; eine 0,015proz. Lösung zu einer 0,006proz. Glucoselösung wie 20 : 19,2. Eine Lösung von Hexosephosphorsäure gibt also im Mittel einen Wert entsprechend 41,7 Proz. der gleichkonzentrierten Glucoselösung. Da das Molekulargewicht unseres Salzes 434 beträgt, so ist das Verhältnis der Molekulargewichte von hexosediphosphorsaurem Ca zu Glucose wie 100 : 41,4.

Ein Molekül der Hexosephosphorsäure gibt also mit Indol und H_2SO_4 eine solche Farbe, als ob das in ihm vorhandene Kohlehydrat frei reagieren würde.

Unter diesen aufgezählten Substanzen verhalten sich Glucuronsäure, Methylglykosid und Hexosephosphorsäure wie die Hexosen, indem sie auch in starken Verdünnungen eine deutliche braune Farbe geben, die annähernd proportional ist und durch Glucosezusatz nicht ausgelöscht wird.

d) Die Farben von Eiweißkörpern und Nucleinsäure.

1. *Ovalbumin.* Ein ½ g *Ovalbumin (Präparat Merck)* wurde in 100 ccm n/10 NaOH gelöst. Diese Lösung verhielt sich zu einer Glucoselösung von 0,022 wie 20 : 21. Sie entsprach somit 0,0207 Proz. Glucose. Auf Glucose umgerechnet enthält das Albuminpräparat somit 4,2proz. Kohlehydrat.

1 g *Ovalbumin Kahlbaum* wurde in 100 ccm n/10 NaOH gelöst. Diese Lösung verhielt sich zu einer Zuckerlösung von 0,03proz. Glucose wie 15 : 19,7; auf Glucose umgerechnet, enthielt das Präparat somit 2,33 Proz. Glucose. 2 g Ovalbumin (*Kahlbaum*) wurden mit 100 ccm destilliertem H_2O einige Stunden geschüttelt. Dann das nicht gelöste Albumin abzentrifugiert, in der Lösung der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt und nach Multiplikation mit 6,25 die Konzentration des Albumins annähernd mit 1,57 Proz. ermittelt. Der Farbtiter dieser Lösung nach der Indol-H_2SO_4-Reaktion verhielt sich zu dem einer Glucoselösung von 0,029 Proz. wie 12,3 : 10, entsprechend einem Kohlehydratgehalt von 2,28 Proz., in guter Übereinstimmung mit dem vorigen Wert. Proportionalitätsversuch mit Ovalbuminlösung: Eine Lösung von 1,57 Proz. Albumin verhielt sich zu einer Lösung von 0,78 Proz. wie 19,2 : 10. Die Farbstärke ist als annähernd der Konzentration proportional.

Zusatzversuch mit Zucker. Eine Lösung von 0,78 Proz. wurde mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 0,029proz. Glucose vermischt. Diese Lösung verhielt sich zu einer Lösung von 0,0358 Proz. Glucose wie 10 : 16. Daraus ergibt sich, daß sich die von Ovalbumin stammende Farbe zur Glucose in Gemisch beider Stoffe *vollkommen addiert.* 5 ccm einer Lösung von 1,57proz. Ovalbumin wurde mit soviel 10proz. HCl versetzt, daß die Konzentration daran 2,2 Proz. betrug, und in ein Wasserbad gestellt. Nach 2 Stunden wurde die Lösung auf 10 ccm aufgefüllt und mit einer 0,78proz. Ovalbuminlösung kolorimetrisch verglichen. Es zeigte sich dabei Farbengleichheit der beiden Lösungen. Das im Ovalbumin enthaltene Kohlehydrat erleidet somit durch eine 2,2proz. Salzsäurehydrolyse keine derartige Veränderung, die die Reaktion mit Indol und H_2SO_4 beeinflussen würde.

2. *Seralbumin.* 2 g Seralbumin (*Merck*) wurden ebenso wie Ovalbumin mit 100 ccm destilliertem H_2O einige Stunden geschüttelt, die Lösung abzentrifugiert und mit *Kjeldahl* der Eiweißgehalt der Lösung als annähernd 1,97 Proz. ermittelt. Der Farbtiter dieser Lösung verhielt sich zu der einer 0,024proz. Glucoselösung wie 15 : 20, entsprach also einem Kohlehydratgehalt des Präparats von 1,08 Proz. Eine Seralbuminlösung von 0,98 Proz. verhielt sich zu einer ebensolchen 1,97proz. wie 10,8 : 20, die Farbstärke ist mithin der Konzentration annähernd proportional. Bei einem Glucosezusatzversuch zu einer Seralbuminlösung, so daß ihre Konzentration an Glucose 0,012 Proz. und an Seralbumin 0,98 Proz. war, wurde festgestellt, daß sich die beiden Farben fast vollkommen addieren. Ein Hydrolysen-

versuch mit 2,2 Proz. HCl zeigte, daß die Hydrolyse keinen Einfluß auf den Farbtiter besitzt.

3. *Tierisches nucleinsaures Na.* Es stand uns ein Präparat von nucleinsaurem Na zur Verfügung, das von Prof. *Levene* (New York, Rockefeller) dem hiesigen Institut in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden war. Eine Lösung von 0,4 Proz. des Präparats verhielt sich zu einer Lösung von 0,03proz. Glucose wie 16,8 : 17,7, eine Lösung von 0,2proz. nucleinsaurem Na verhielt sich zu einer solchen von 0,4 wie 13 : 20. Die Farbe ist somit der Konzentration an Nucleinsäure nicht proportional.

Einfluß der Hydrolyse mit 2,2proz. HCl auf den Farbtiter der Nucleinsäurelösung. Versetzt man eine Lösung von nucleinsaurem Na mit so viel 10proz. Salzsäure, daß die Konzentration an HCl 2,2 Proz. beträgt, so fällt die Nucleinsäure aus, stellt man die salzsaure Lösung für 3 Minuten ins kochende Wasserbad, so löst sich die Nucleinsäure wieder vollständig auf. Diese Lösung zeigt nun bei der Indol-H_2SO_4-Reaktion ein Anwachsen des Farbtiters gegenüber der nicht mit HCl versetzten Lösung von nucleinsaurem Na um 30 Proz. Läßt man eine Lösung statt durch 3 Minuten durch 10 Minuten im Wasserbad stehen, so bemerkt man kein weiteres Anwachsen des Farbtiters. Läßt man die salzsaure Lösung durch 2 Stunden im Wasserbad, so zeigt sich wieder ein Absinken des Farbtiters von seinem höchsten Wert, etwa um 20 Proz., also noch immer ein um 10 Proz. höherer Wert als bei der nicht hydrolysierten Lösung.

Hefenucleinsaures Natrium. Eine 0,4proz. Lösung von hefenucleinsaurem Na gibt mit Indol und H_2SO_4 erhitzt eine Farbe, die der Farbe der Pentosen entspricht und in der Stärke einer Lösung von 0,11proz. Arabinose gleicht. Es wurde hier Arabinose als Standardlösung verwendet, da man annimmt, daß eine Pentose das in der pflanzlichen Nucleinsäure vorhandene Kohlehydrat ist. Entsprechend der Annahme *Levenes*, daß ein Molekül Nucleinsäure vier Moleküle Pentose enthält, wäre zu erwarten gewesen, daß die Farbkraft etwa 40 Proz. der gleichen Menge Pentose ausmachen würde. In Wirklichkeit macht sie aber nur 25 Proz. aus. In dem Konzentrationsgebiet von 0,2 bis 0,4 Proz. ist die Farbe der Konzentration proportional. Im Gegensatz zu den tierischen Nucleinsäuren zeigt sich hier bei ganz kurzdauernder Hydrolyse mit 2,2proz. Salzsäure im siedenden Wasserbad kein Ansteigen des Farbtiters.

e) Die Spezifität der Reaktion.

Weehuyzen und *Fleig* geben an, daß diese Reaktion für Kohlehydrate spezifisch ist. Von den Eiweißkörpern sollen sie nur diejenigen geben, die beim Kochen mit Säuren Furfurol bilden. Wir haben gefunden, daß von einer Spezifität, wie sie von diesen Autoren behauptet worden ist, keine Rede sein kann. Sehr viele organische Substanzen, wie die verschiedenen Aminosäuren, Fette und Glycerin geben mit H_2SO_4 und Indol in einer Konzentration von 1 Proz. und darüber eine gelbe bis gelbbraune Farbe, die sich von den Farbtönen, wie sie mit ganz verdünnten Lösungen von Hexose auftreten, im Farbton wesentlich unterscheiden und deswegen schwer verglichen werden können.

Eine angenäherte Schätzung gibt z. B. für Tyrosin, Glycerin, Alanin eine Farbintensität, die ungefähr *100mal kleiner ist als die einer gleichkonzentrierten Hexoselösung.* Z. B. gab eine 1proz. *Alaninlösung* eine Farbe, die ungefähr einer 0,01proz. Glucose entspricht. Eine 0,4proz. Lösung von harnsaurem Na ergab eine Reaktion, die in ihrer Farbintensität ebenfalls etwa einer 0,01proz. Glucoselösung entsprach. Eine 5proz. *Caseinlösung* ergab mit H_2SO_4 und Indol erhitzt, eine gelbe Farbe, die in ihrer Intensität etwa einer 0,009proz. Glucoselösung entsprach. Eine viel stärkere Reaktion zeigt der *Acetaldehyd,* von dem eine 0,25proz. Lösung eine orangebraune Farbe gab, die einer 0,04proz. Zuckerlösung entsprach. Hier war das Verhältnis der Farbstärke Acetaldehyd zu Glucose wie 1 : 6. Das Verhalten des Acetaldehyds legte den Gedanken nahe, daß auch die *Milchsäure,* die beim Erhitzen mit konzentrierter H_2SO_4 in Acetaldehyd bzw. Paraldehyd übergeht, eine entsprechende Reaktion mit H_2SO_4 und Indol geben könnte. Diese Vermutungen bewahrheiteten sich nicht, denn als wir Milchsäure daraufhin untersuchten, stellte sich heraus, daß sie erst in sehr hohen Konzentrationen, etwa 1 Proz., eine schwache Farbe gibt. Ganz ähnlich verhalten sich *Aceton* und *β-Oxybuttersäure.* Ebenso gaben *Cholesterin* und *Kreatin* gelbe Färbungen von derselben Größenordnung wie Casein und die Aminosäuren.

Ergeben auch diese Versuche, daß man von einer absoluten Spezifität der Reaktion für Kohlehydrate nicht sprechen kann, da auch viele andere Körper mit Indol und H_2SO_4 eine Farbreaktion geben, so kann man doch von einer relativen Spezifität der Reaktion für Kohlehydrate sprechen. Denn alle die anderen Stoffe, die mit Indol und H_2SO_4 reagieren und die im Blute und Organen neben Kohlehydraten vorkommen können, geben diese Reaktion erst in so hohen Konzentrationen, wie sie praktisch nicht in Betracht kommen. Prüft man Aminosäuren, Glycerin, Cholesterin und Harnsäure auf ihre Reaktionsfähigkeit mit H_2SO_4 und Indol in solchen Konzentrationen, wie sie im Blute oder Organhydrolysaten vorkommen, so ergeben sie alle eine schwache, kaum wahrnehmbare Farbe. Nun könnte man allerdings einwenden, daß, wenn z. B. Aminosäuren eine 100mal schwächere Farbe geben als die Glucose, eine 0,1proz. Aminosäurelösung somit einer 0,001proz. Glucoselösung entspricht und zwar für sich allein eine äußerst schwache Farbe gibt, daß sich aber eine Reihe von solchen Farben von verschiedenen Körpern, die im Blute vorkommen, addieren und so die Reaktion empfindlich stören könnten.

Die Konzentrationen der *Aminosäuren* im Blute können bei Lebererkrankungen bis 1 Proz. betragen. Die Konzentration der Fette endlich und des Cholesterins macht zusammen einige Zehntel Prozent aus. Wenn nun diese Stoffe eine 30 bis 100mal schwächere Farbe geben als der Traubenzucker, so würde sie doch bei der Traubenzuckerbestimmung im Blute einen Fehler von 4 bis 5 Proz. bedingen, das allerdings unter der Voraussetzung, daß erstens die Farbe jedes einzelnen Stoffes bis zu einem gewissen Grade seiner Menge proportional ist und zweitens, daß die Farben dieser Stoffe sich untereinander addieren, drittens, daß diese Stoffe auch in Gegenwart von Traubenzucker mit Indol eine ihrer Menge vollkommen entsprechende Farbe ergeben.

Um diese Fragen zu entscheiden, haben wir die folgenden Versuche gemacht.

f) Versuche über den Einfluß von Beimengungen nicht kohlehydratartiger Substanzen auf den Farbentiter von Kohlehydraten.

1. Versuche mit Alanin.

Von einer 0,09proz. Traubenzuckerlösung wurde je 1 ccm mit 5 ccm einer 1proz. Alaninlösung und 5 ccm destilliertem Wasser versetzt. Von diesen Gemischen, von denen jedes 0,015 Proz. Glucose enthielt, wurde mit je 1 ccm die Indolreaktion angesetzt. Die Farbintensität war in beiden Proben die gleiche. Es zeigte sich also, daß ein Gehalt von 0,84 Proz. Alanin auf die Reaktion einer 0,015proz. Zuckerlösung keinen Einfluß mehr hat. Die Alaninlösung würde, für sich allein angewendet, einer Glucoselösung von 0,008 Proz. entsprechen. Bei einer Addition beider Farben müßte eine Erhöhung um 50 Proz. auftreten, die also hier vollkommen fehlt.

2. Versuche mit Casein.

Je 1 ccm einer 0,09proz. Zuckerlösung wurde mit 5 ccm einer 5proz. einer 2proz. und einer 0,5proz. Caseinlösung und mit H_2O versetzt. Von jedem dieser Gemische wurde mit je 1 ccm die Indolreaktion angesetzt.

Konzentration der mit destilliertem H_2O versetzten Zuckerlösung	0,015	Proz.
A. Farbintensität mit 5proz. Casein	0,0172	„
B. „ „ 2 „ „	0,0165	„
C. „ „ ½ „ „	0,0149	„

Die Konzentration des Caseins in der Probe A entsprach somit 4,2 Proz.; da eine 5proz. Caseinlösung eine Farbe gibt, die ungefähr 0,009proz. Zucker entspricht, so würde auch unter der Voraussetzung, daß in einem Intervall von 5 bis 4,2 Proz. die Farbe dem Caseingehalt proportional ist, der auf das Casein entfallende Anteil der Farbstärke etwa 0,0075 Proz. Glucose entsprechen, d. h. die mit Casein versetzte Probe A müßte eine Erhöhung gegenüber der Kontrolle um 50 Proz. zeigen. Tatsächlich betrug sie nur 15 Proz. Auch hier eine wesentliche Herabsetzung der Eigenreaktion des Caseins. Sinkt der Caseingehalt einer 0,015proz. Zuckerlösung unter 1,5 Proz., so ist überhaupt keine Beeinflussung der Zuckerfarbe festzustellen.

3. Caseinhydrolysate.

Eine 1proz. Lösung von Na-Caseinat wurde mit so viel HCl versetzt, daß die Lösung zum Schluß 2,2 Proz. salzsauer war. 3 Stunden wurde auf dem Wasserbad erhitzt, dann abfiltriert, dann je 1 ccm einer 0,1proz. Glucoselösung mit je 5 ccm bzw. 10 ccm des Na-Caseinhydrolysats versetzt, zugleich wurden zwei gleiche Proben mit 5 bzw. 10 ccm Aqua dest. versetzt. Die Glucosekonzentration der Lösungen war in den Proben 0,0166 und 0,009 Proz. Von den vier Proben wurden je 1 ccm entnommen und die Indolreaktion angesetzt. Der Zusatz des Hydrolysats übte in keiner Probe einen Einfluß auf die Farbstärke der Dextrose aus.

4. Mischungsversuche mit Aceton.

Je 1 ccm einer 0,09proz. Glucoselösung wurde mit 5 ccm einer 0,05proz., wässerigen Acetonlösung bzw. 5 ccm Aqua dest. vermischt. Beide Proben wurden miteinander verglichen, die mit Aceton versetzte Glucoselösung zeigte einen um 5 Proz. höheren Farbton als die Leerprobe.

5. Über die Reaktion von Gemischen verschiedener im Blute vorkommender Substanzen und ihre Verwendung zu Mischungsversuchen.

Wir haben auch eine Reihe von Versuchen gemacht, in denen wir Zuckerlösungen Gemische verschiedener, im Blute befindlicher Substanzen hinzufügten und dann feststellten, ob der Farbtiter der Glucoselösungen durch diese Beimischungen verändert wurde. Da aber die Zusammensetzung des Blutes schon bei normalen Individuen und noch mehr unter pathologischen Verhältnissen, wie Leber- und Nierenkrankheiten und Diabetes variiert, stellten wir drei verschiedene Mischungen aus solchen Substanzen, die in größerer Menge im Blut vorkommen, her, und zwar enthielt Mischung I die einzelnen Substanzen in solchen Mengen, wie sie nach den höchsten in der klinischen Literatur vorhandenen Zahlenangaben im sechsfach verdünnten Blute vorkommen. Mischung II entsprach einer ebensolchen Blutmischung bei Nieren-, Mischung III bei Leberkrankheiten.

Diese Gemische verschiedener im Blute vorhandener Substanzen wurden mit Zuckerlösungen von bekanntem Gehalt folgendermaßen vermischt: 1 ccm einer Zuckerlösung von 0,09proz. Glucosekonzentration wurde mit je 5 ccm destilliertem H_2O, Mischung I, II und III versetzt. Die Konzentration der Glucose in den so hergestellten Lösungen war 0,015 Proz. Mit diesen Proben wurde nun die Indol-H_2SO_4-Reaktion angesetzt und der Farbtiter der einzelnen Lösungen miteinander verglichen. In derselben Weise wurden Lösungen von 0,012, 0,008 und 0,006proz. Glucose durch entsprechende Verdünnung einer 0,09proz. Glucoselösung einerseits mit destilliertem Wasser, andererseits mit den drei Mischungen hergestellt. Die Lösungen der Glucose in den drei Mischungen zeigten genau denselben Farbtiter wie die Lösungen in destilliertem H_2O. *Es zeigt sich somit, daß die im Blute in größerer Menge vorkommenden Substanzen auf keinen Fall selbst in pathologischen Fällen die Bestimmung der Kohlehydrate im Blute zu stören imstande sind.*

6. Einfluß der Beimischungen von Salzsäure zur Glucoselösung.

Da die Zuckerindolreaktion beim Ansetzen mit HCl statt mit H_2SO_4 einen mehr gelbbraunen Farbton gibt, der sich von dem mit H_2SO_4 erhaltenen rein braunen Farbton unterscheidet, war es naheliegend, zu untersuchen, ob nicht schon kleine Mengen HCl einen Einfluß auf Farbton und Intensität der Indol-H_2SO_4-Reaktion aufweisen. Dies war von um so größerer Wichtigkeit, weil ja bei Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen man zu einer Hydrolyse der Organe in 2,2proz. Salzsäure greift, die Bestimmung des Zuckers also in diesem Falle in einer salzsäurehaltigen Lösung erfolgt.

Je 1 ccm einer 0,09proz. Glucoselösung wurde mit je 5 ccm einer 2,4-, 1,2-, 0,6proz. HCl und 5 ccm destilliertem H_2O versetzt. Die mit

destilliertem H_2O und 0,6 Proz. HCl versetzte Lösung zeigte keinen Unterschied in der Intensität und Qualität der Farbe, die zwei anderen Lösungen zeigten eine Abschwächung der Farbe, die zugleich einen Stich ins Gelbliche bekam. Die *Abschwächung* betrug bei der Mischung mit 1,2 Proz. HCl 7 Proz., bei der anderen sogar 12 Proz.

Enthält also eine Glucoselösung, die man mit einer Standardlösung vergleichen will, über ½ Proz. HCl bzw. NaCl, so muß man der Standardlösung so viel HCl zusetzen, daß ihre Konzentration derjenigen in der anderen Lösung ungefähr gleicht.

Aus all diesen Mischungsversuchen geht hervor, daß man die Reaktion als spezifisch für Kohlehydrate ansehen kann, in Fällen, in denen die Konzentration von anderen organischen Substanzen nicht eine verhältnismäßig zu große ist. In Organhydrolysaten und Körpersäften ist auch unter pathologischen Verhältnissen die Relation der Konzentrationen der anderen organischen Substanzen zu der der Glucose keine solche, daß dadurch die Farbstärke der Kohlehydrate beeinflußt werden könnte. Es sprechen also auch diese Mischungsversuche und Untersuchungen der Spezifität der Reaktion der Kohlehydrate mit Indol und 77,5 vol.-proz. H_2SO_4 dafür, sie als Prinzip einer kolorimetrischen Bestimmungsmethode für Kohlehydrate zu verwenden.

Die Reaktion der Kohlehydrate mit Skatol und konzentrierter Schwefelsäure zu untersuchen, erwies sich als wenig aussichtsreich, da Skatol mit Schwefelsäure allein erhitzt, eine starke rotviolette Eigenfarbe gibt, die bei Gegenwart der Kohlehydrate wohl bedeutend stärker ist, die starke Eigenfarbe ist aber sicherlich ein Hindernis für eine exakte Bestimmung. Ähnlich liegen auch die Verhältnisse sowohl für Indol als auch für Skatol bei Verwendung von 85proz. Phosphorsäure, bei der auch starke Eigenfarben ohne Kohlehydrate auftreten, die ebenso wie oben durch die Gegenwart von Kohlehydrat noch bedeutend vermehrt werden.

D. Über die Reaktion von Monohexosen in alkoholischer Lösung mit Indol und Schwefelsäure.

Da bei Bestimmung von Glucose in Lösungen, in denen außer diesem Zucker noch komplexe Kohlehydrate, eventuell noch Eiweißkörper sich befinden, wie es z. B. im Blute der Fall ist, zur Ausfällung dieser beiden letzteren Alkohole verwendet wird und so die Filtrate alkoholische Glucoselösungen repräsentieren, so untersuchten wir den Einfluß des Alkoholzusatzes auf die Reaktion des Zuckers mit Indol und Schwefelsäure. Diese Reaktion haben wir so angesetzt, daß wir eine 0,05proz. wässerige Glucoselösung mit 9 Teilen Alkohol vermischt haben. Von diesem Gemisch wurden 3½ ccm mit 6 ccm konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Es zeigte sich, daß dieses Gemenge nicht einen braunen Farbton, sondern eine rote Farbe besaß. Variierte man die Konzentration der zugesetzten H_2SO_4, so zeigte sich, daß schon bei Verwendung der 90vol.-proz. H_2SO_4 wiederum eine braune Farbe resultierte. Ging man mit der Konzentration der H_2SO_4

noch weiter hinunter, so war die braune Reaktionsfarbe immer schwächer, ähnlich wie bei den wässerigen Lösungen.

Was die Abhängigkeit der Farbstärke dieser Reaktion von der Konzentration der alkoholischen Glucoselösung betrifft, so war es ganz dieselbe, wie es bei wässerigen Lösungen bei Verwendung der 77,5vol.-proz. Säure der Fall war. Auch bei dieser Lösung stieg der Farbtiter nicht vollkommen proportional mit der Konzentration an, sondern auch hier war die Farbe, die eine um 100 Proz. stärker konzentrierte Lösung gab, nicht um 100 Proz., sondern um 100 — 20 = 80 Proz. stärker als die erste Lösung, also derselbe Unterschied um 20 Proz.

Es zeigte sich dabei, daß, wenn die Reaktion mit konzentrierter H_2SO_4 angesetzt wird, verschieden konzentrierte Lösungen sich nur schwer miteinander vergleichen lassen, weil sie sich nicht nur qualitativ, sondern auch in ihrem Farbton unterscheiden, indem die stärker konzentrierte Lösung rubinrot, die schwächere schwach violettrot erscheint.

Den roten Farbstoff mit Indol und konzentrierter H_2SO_4 gibt auch die Fructose, und zwar ungefähr so stark wie die Glucose. Die Arabinose in alkoholischer Lösung dagegen gibt sowohl mit verdünnter als auch mit konzentrierter H_2SO_4 eine braune Farbe. Ebenso weicht die rote Farbe der Glucose einer braunen, wenn außer Glucose sich noch andere organische Substanzen in der Lösung befinden, wie z. B. Seifen, Cholesterin, Aminosäuren. Dieser Umstand hindert, die schöne rote Farbe, die ansonsten sehr spezifisch ist, für eine Bestimmungsmethode zu verwenden.

Für eine Bestimmungsmethode in alkoholischen Lösungen oder Filtraten kommt also nur der Vorgang in Betracht, daß man zu 3½ ccm der Lösung unter scharfer Kühlung im kalten Wasser oder besser Eis 6 ccm konzentrierter H_2SO_4 und 0,3 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung hinzufügt und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Es tritt dann eine Farbe auf, die der aus wässerigen Lösungen mit der 75,5vol.-proz. H_2SO_4 entstandenen völlig gleicht.

Auf der Indolschwefelsäurefarbe in wässeriger Lösung haben wir nun ein Verfahren sowohl zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen als auch in Körpersäften aufgebaut, über das nun im folgenden berichtet werden soll.

E. Zusammenfassung von II.

Überblicken wir sämtliche Beobachtungen über die Reaktionen der Zucker mit Indol und Skatol, die oben mitgeteilt worden sind, so bemerken wir, daß unter diesen Reaktionen zwei Gruppen unterschieden werden können. Zur ersten Gruppe gehören die Reaktionen in verdünnten Säuren und konzentrierter HCl, zur zweiten die in konzentrierter H_2SO_4. Diese zwei Gruppen unterscheiden sich voneinander durch *vier Merkmale*: 1. Die Reaktion der Gruppe I geht schon bei einer *Temperatur von 70 bis 80°* vor sich. Setzt man also eine für diese Reaktion angesetzte Probe ins kochende Wasserbad, so tritt die Farbe schon vor Ablauf der ersten Minute auf. Die Temperatur der Probe liegt in diesem Zeitpunkt im obenerwähnten Intervall.

2. Bei der Reaktion I verhalten sich die Hexosen in bezug auf *Qualität des gebildeten Farbstoffs* ganz verschieden von den anderen Kohlehydraten und kohlehydratartigen Verbindungen. So geben z. B.

nur Hexosen die violette Farbe mit Skatol und konzentrierter HCl. Die Pentosen, Nucleinsäuren, pflanzliche und tierische, sowie Glucuronsäure geben eine braune Farbe, und auch diese in viel schwächerem Grade als die Hexosen die ihre. Analoges gilt für die Reaktion mit Indol in verdünnter HCl und H_2SO_4. Mit Indol und konzentrierter H_2SO_4 dagegen geben sowohl Hexosen wie Pentosen, Nucleinsäuren und Glucuronsäure eine braune Farbe.

3. Bei der Reaktion I gibt *Lävulose* und ihre Verbindungen eine *unvergleichlich stärkere* Farbe als Glucose. Dieser Unterschied ist besonders groß bei Verwendung von verdünnter (10proz.) Salzsäure. Darin zeigt sich eine Ähnlichkeit der Reaktion I mit den anderen zur Erkennung der Fructose bisher verwendeten Reaktionen, z. B. der *Seliwanoff*schen. Nun wird allgemein angenommen, daß die *Seliwanoff*sche und die analogen Reaktionen auf der Bildung von Oxymethylfurfurol aus Fructose beim Erhitzen mit verdünnten Säuren beruhen. Es bildet sich unter diesem Umstand auch aus Dextrose etwas Oxymethylfurfurol, aber unvergleichlich weniger als aus Lävulose. Es liegt im Bereiche der Möglichkeit, daß auch die Reaktion der Monohexosen mit Indol und Skatol in *verdünnter Salzsäure* auf Bildung von Oxymethylfurfurol zurückzuführen ist, da sie ja der *Seliwanoff*schen Reaktion in mancher Beziehung sehr ähnlich ist.

4. Bei der Reaktion II zeigen die *Di- und Polysaccharide* ebenso wie *Methylglucosid* und *Hexosephosphorsäure*, alles Verbindungen, in denen die Zuckermoleküle entweder miteinander oder mit anderen Atomgruppen durch ihre *Sauerstoffatome* verbunden sind, ein solches Verhalten, als ob die gebundenen Monohexosenmoleküle frei wären und als solche reagierten. Bei der Reaktion I ist das nicht der Fall. Die Saccharose gibt z. B. mit Skatol und konzentrierter HCl eine zweimal so starke Farbe, als es ihrem Fructosegehalt entspricht. *Was die Eignung dieser Reaktionen betrifft, als Grundlage einer kolorimetrischen Bestimmungsmethode der Kohlehydrate in tierischen Organen und im Blute zu dienen, so erscheint nur die Reaktion mit Indol und 77½ vol.-proz. H_2SO_4 hierfür verwendbar.* Denn bei den Reaktionen mit konzentrierter HCl zeigen ja Lösungen gleicher Glucosekonzentration oft bis 12 Proz. abweichende Farbwerte. Die Reaktionen mit verdünnter HCl sind für Traubenzucker zu wenig empfindlich. Ob sich auf ihnen eine Bestimmungsmethode für *Fructose* und *Saccharose* in Gemischen mit Glucose wird aufbauen lassen, soll Gegenstand einer späteren Untersuchung bilden.

Die Reaktion mit Indol und 77½ vol.-proz. H_2SO_4 hat nur scheinbar den Nachteil, daß auch Nichtkohlehydrate in großer Konzentration dabei eine gelbbraune Farbe geben. Wir haben aber gesehen, daß in Gemischen mit Glucose die Eigenfarbe dieser Stoffe sich nicht bemerkbar macht. Worauf diese „Auslöschung" beruht, ist vorläufig unklar.

III. Methode zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen.

Der erste Schritt zur Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen ist ihre Extraktion aus dem fein zerkleinerten Gewebe.

Nach den zumeist angewendeten Verfahren wurde sie dadurch bewerkstelligt, daß man den Gewebsbrei durch 2 Stunden auf dem Wasserbad mit 2,2 Proz. HCl hydrolysierte. 97 Proz. des Glykogens sollen dabei nach *Löwi*[1]) in Glucose übergehen, eine Zerstörung der Glucose während dieser Zeit nicht in nennenswertem Maße stattfinden. Aber nach diesem Verfahren gehen zweifellos auch Kohlehydrate, die an Eiweiß und Nucleoproteide gebunden sind, in Lösung. Man ist sowohl über die Natur dieser Kohlehydrate, wie auch über ihr Reduktionsvermögen nicht ganz im klaren. Bestimmt man also das Reduktionsvermögen oder den Farbtiter nach der hier angegebenen Methode des in oben beschriebener Weise erhaltenen Gewebshydrolysats, so wird selbst nach der von *Neuberg-Löwi* vorgeschriebenen Ausfällung der N-haltigen reduzierenden Substanzen ein Teil dieses Reduktionsvermögens oder dieses Farbtiters durch diese, aus Eiweißstoffen und Nucleinsäuren abgespaltenen Kohlehydrate bestimmt. Die Menge der Gesamtkohlehydrate in einem Organhydrolysat wird in üblicher Weise so errechnet, daß man diejenige Menge Glucose berechnet, die das gleiche Reduktionsvermögen wie das Hydrolysat besitzt. Dieser Wert ist natürlich mit dem wirklichen Wert an Gesamtkohlehydraten nicht identisch. Um den letzteren zu erhalten, müßte ein Extraktionsverfahren gefunden werden, das die oben erwähnten Kohlehydratfraktionen in den Organen voneinander getrennt in Lösung bringt.

Saho Kose[2]) hat nämlich gefunden, daß, wenn man Kaninchenleber zunächst in 60proz. KOH zur Auflösung bringt und nach Neutralisation mit konzentrierter HCl die Lösung auf 2 Proz. HCl bringt, die saure Lösung nun 2 Stunden im Wasserbad erhitzt und dann nach *Neuberg-Löwi* das Hydrolysat mit Quecksilberacetat ausfällt und nun die gebildete Glucose durch Hefe vergärt, noch eine Restreduktion gegenüber alkalischer Cu-Lösung sich nachweisen läßt, die z. B. bei der Kaninchenleber auf Glucose umgerechnet 0,3 Proz., bei Muskeln 0,2 Proz. des Feuchtgewichts ausmacht. Nun ist uns weder das Reduktionsvermögen noch der Farbtiter bei der Indolreaktion von dieser *Restreduktion* bekannt. Wir sind also gar nicht imstande, ohne vorherige Trennung der in einem Organ befindlichen einzelnen Kohlehydrate den wirklichen Gesamtkohlehydratgehalt zu bestimmen.

Was wir bei jeder Gesamtkohlehydratbestimmung in einem Organhydrolysat in Wirklichkeit bestimmen, ist die Konzentration derjenigen Glucoselösung, die sich in bezug auf ihr Reduktionsvermögen bzw. ihren Farbtiter nach unserem Verfahren genau so verhalten würde, wie das Organhydrolysat selbst. Die Kenntnis dieses reduzierten Gesamtkohlehydratgehalts der Organe genügt aber bei den meisten physiologischen Untersuchungen, bei denen es ja in der Regel nicht so sehr auf den absoluten als auf den relativen Wert der Gesamtkohlehydrate in Organen ankommt. Von dieser Erwägung ausgehend, haben wir für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate nach unserem Verfahren für ihre Extraktion nicht die von *Pflüger* für die Glykogenbestimmung angegebene Auflösung der Organe in 60proz. Kalilauge in der Wärme, sondern das oben erwähnte *Löwische*

[1]) *Löwi*, l. c.

[2]) *Saho Kose*, Ber. über die ges. Physiol. 22, 239.

Verfahren gewählt, bei dem der Organbrei durch 2 Stunden mit 2,2proz. HCl hydrolysiert wird. Dabei gehen sicherlich weniger Kohlehydrate aus Eiweißstoffen und Nucleoproteiden in Lösung als bei dem ersteren Verfahren; aber die vollständige Extraktion ist vorläufig für physiologische Zwecke ohne Bedeutung.

Durch die oben mitgeteilten Mischungsversuche ist erwiesen worden, daß Casein, Caseinhydrolysat, Aminosäuren und noch andere im Blute und Organen vorkommende Substanzen, Zuckerlösungen beigemischt, den Farbtiter derselben nicht beeinflussen. Es könnten aber immerhin in Organen bzw. deren Salzsäurehydrolysaten sich Substanzen befinden, deren Beimischungen zu Zuckerlösungen nicht so harmlos sind.

Es empfahl sich deshalb ein Vergleich zwischen den Werten von Organhydrolysaten *vor und nach einer Ausfällung der N-haltigen Substanzen mit Quecksilberacetat nach Neuberg-Löwi.*

Um dies festzustellen, wurde in einer Reihe von Fällen eine Mäuseleber fein zerrieben und mit 2,2proz. HCl auf dem Wasserbad erhitzt, das Hydrolysat in einem Meßkölbchen auf 25 ccm mit destilliertem H_2O aufgefüllt und durch ein Faltenfilter filtriert. Von dem Filtrat wurden 10 ccm mit H_2O auf die Hälfte verdünnt (Probe A); 10 ccm wurden neutralisiert, mit Quecksilberacetat nach *Neuberg-Löwi* ausgefällt und mit H_2O auf 20 ccm aufgefüllt und filtriert (Probe B), dann wurde das Quecksilber mit H_2S entfernt, vom HgS abfiltriert und der H_2S durch Luftdurchleiten aus dem Filtrat vertrieben. Mit A und B wurde die Indol-H_2SO_4-Reaktion angesetzt. In folgender Tabelle ist der Kohlehydratgehalt der Mäuseleber in der Rubrik 1 aus der Probe A ermittelt, in der Rubrik 2 aus der Probe B ermittelt.

Tabelle V.

Maus	Kohlehydratgehalt der Leber		Maus	Kohlehydratgehalt der Leber	
	ohne Fällung Proz.	mit Fällung Proz.		ohne Fällung Proz.	mit Fällung Proz.
1	3,21	3,17	4	1,83	1,90
2	2,68	2,75	5	2,44	2,41
3	4,74	4,73	6	3,61	3,52

Es zeigt sich also, daß die Unterschiede innerhalb der Fehlerquellen liegen. *Die Ausfällung der Eiweißabbauprodukte und Purinbasen im Organhydrolysat ist demnach bei Anwendung unseres kolorimetrischen Verfahrens entbehrlich.*

Vorschrift für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen.

Je nach dem erwarteten Kohlehydratgehalt werden 0,1 bis 0,5 g lebensfrischen Organs in einer Reibschale fein zerrieben, mit 2 bis 3 ccm destillierten H_2O versetzt, und wird die so entstehende Gewebssuspension in eine Eprouvette gegossen; die Reibschale und Pistille werden ein- bis zweimal mit derselben Menge H_2O nachgewaschen und die Waschflüssigkeit so in die Eprouvette hineingegossen, daß die bei der

Überführung der Suspension aus der Reibschale in die Eprouvette an der Wand derselben haften gebliebenen Gewebspartikeln heruntergespült werden. Es wird nun so viel 10 bis 20proz. HCl hinzugefügt, daß die Konzentration der Flüssigkeit an HCl 2,2 Proz. beträgt. Die Eprouvette wird nun mit Zellstoff oder besser Glaswolle verschlossen und im Wasserbad unter häufigerem Umschütteln durch 2 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Inhalt der Eprouvette in ein Meßkölbchen übergeführt, die Eprouvette mit wenig H_2O nachgewaschen und damit aufgefüllt. Das Volumen des Kölbchens soll so gewählt werden, daß die voraussichtliche Konzentration der Kohlehydrate nicht kleiner als 0,005 Proz. und nicht größer als 0,05 Proz. sei. Der Kölbcheninhalt wird nun durch ein quantitatives Filter (*Schleicher* und *Schüll*-Blauband) gegossen, da die gewöhnlichen Filter kohlehydratartige Substanzen an das Filtrat abgeben.

1 ccm des Filtrats wird mit 9 ccm einer H_2SO_4 versetzt, die man sich in der Weise herstellt, daß man 77,5 ccm einer konzentrierten Schwefelsäure von spezifischem Gewicht 1,84 unter Kühlung unter der Wasserleitung mit destilliertem H_2O auf 100 auffüllt. Nach Zusatz der H_2SO_4 zur kohlehydrathaltigen Flüssigkeit wird abgekühlt und nach Erkalten die Lösung mit 0,3 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung (wir verwendeten Indol *Merck*) versetzt. Es wird umgeschüttelt und wiederum abgekühlt. Die sorgfältige Abkühlung vor und nach Zusatz der Indollösung ist von Bedeutung, da sonst schon vor dem Erhitzen in dem Wasserbad bei der Berührung der alkoholischen Indollösung mit der heißen H_2SO_4 ein brauner Farbstoff sich bildet, der die Bestimmung stört. Als Standard benutzt man eine Glucoselösung von bekanntem Gehalt.

Da bekanntlich bei kolorimetrischen Bestimmungen die Konzentration des Standards sich möglichst wenig von der Konzentration der zu untersuchenden Lösung unterscheiden soll, stellt man sich die jeweilige *Standardlösung* immer frisch durch Verdünnen einer *Vorratslösung* her. Die Vorratslösung bereitet man sich zweckmäßig in der Weise, daß man eine 5proz. wässerige Glucoselösung im Verhältnis 1 : 10 mit 80proz. Alkohol verdünnt. Eine solche Lösung ist sehr lange haltbar. Die geringe Menge Alkohol, die dabei in die Standardlösung kommt, ist für die Reaktion ohne jede Bedeutung. Bei der Bereitung der Standardlösung aus der Vorratslösung muß man so viel HCl hinzufügen, daß die Konzentration in der Standardlösung möglichst gleich derjenigen ist, die in der auf ihren Kohlehydratgehalt zu untersuchenden Lösung vorhanden ist.

Die zur Verwendung kommenden Eprouvetten müssen absolut trocken und rein sein, sie werden zweckmäßig mit heißer H_2SO_4 und

destilliertem Wasser gewaschen. Die Vorfarbe bei der Reaktion muß grüngelb sein und es dürfen sich keine roten oder braunen Töne zeigen. Ist das der Fall, so war entweder die Eprouvette durch größere Mengen organischer Substanzen verunreinigt gewesen oder das Reaktionsgemisch vor und nach Zugabe des Indols zu wenig abgekühlt worden.

Für die Bestimmung wählt man zweckmäßig weite lange Eprouvetten, um das Durchmischen der Flüssigkeiten bequem bewerkstelligen zu können. Man erhitzt in einem siedenden Wasserbad mit herausnehmbarem Einsatz für ungefähr zehn Eprouvetten, um alle Proben gleichmäßig zu erhitzen. Der Einsatz des Wasserbads muß so gebaut sein, daß die Eprouvetten den Boden des Topfes nicht berühren, sondern nur auf dem Einsatz stehen. Man erhitzt 10 Minuten und stellt nach dem Erhitzen den Einsatz mit den Eprouvetten in einen Topf mit kaltem Wasser. Die Flüssigkeit in den Eprouvetten soll sich während der ganzen Zeit des Erhitzens vollkommen unter dem Spiegel des Wasserbads befinden.

Man kolorimetriert am besten im Dubosqkolorimeter. Doch kann man mit kleineren Änderungen selbstverständlich auch jedes andere Kolorimeter benutzen.

Da, wie in II beschrieben, das Verhältnis der kolorimetrisch ermittelten Farbstärken zweier Lösungen nicht vollkommen mit dem tatsächlichen Verhältnis ihrer Kohlehydratkonzentrationen übereinstimmt, so benötigt man die Anbringung einer *Korrektur* an dem kolorimetrisch gefundenen Verhältnis, um daraus das tatsächliche zu ermitteln.

Aus der in II beschriebenen Abweichung von der Proportionalität ergibt sich nämlich durch einfache Prozentrechnung die Gesetzmäßigkeit, daß man von dem kolorimetrisch gefundenen Verhältnis der beiden Lösungen b/a, wobei b die stärker konzentrierte Lösung darstellt (ohne Rücksicht darauf, welche von beiden die Standardlösung ist), 0,2 abziehen muß und die so erhaltene Zahl durch 0,8 dividieren muß, um das tatsächliche Verhältnis der beiden Konzentrationen zu finden.

Ein Beispiel soll diese Berechnung erläutern. Ist Farbengleichheit erzielt worden, wenn der in die Lösung a eintauchende Keil auf 20 steht und der in die Lösung b eintauchende auf 13,3, so ist das kolorimetrisch gefundene Verhältnis der beiden Lösungen b/a gleich 20/13,3, d. i. 1,5, $1{,}5 - 0{,}2 = 1{,}3$, $1{,}3 : 0{,}8 = 16{,}2$. Das wahre Verhältnis der beiden Lösungen b/a ist somit gleich 1,62.

Folgende Tabelle soll die Berechnung erleichtern. Der in die schwächere Lösung a eintauchende Keil stehe bei 20, an dem Keil, der in die stärkere Lösung b eintaucht, wird dann eine der Zahlen der ersten Rubrik abgelesen, in der zweiten Rubrik findet sich dann das kolorimetrisch abgelesene Verhältnis der beiden Lösungen b/a, in der dritten Rubrik das korrigierte, tatsächliche Verhältnis.

Tabelle VI.

Stand des Keils der Lösung b	Kolorimetrisch abgelesene b/a	Tatsächliche b/a	Stand des Keils der Lösung b	Kolorimetrisch abgelesene b/a	Tatsächliche b/a
19	1,05	1,06	11	1,81	2,01
18	1,11	1,14	10	2,00	2,25
17	1,18	1,22	9	2,22	2,53
16	1,25	1,31	8	2,50	2,88
15	1,33	1,41	7	2,86	3,32
14	1,43	1,54	6	3,33	3,91
13	1,54	1,67	5	4,00	4,75
12	1,67	1,84			

Die dazwischen liegenden Zahlen werden leicht durch Interpolation gefunden.

Eine Standardlösung muß immer gleichzeitig mit der zu untersuchenden Lösung miterhitzt werden. Die Ablesung im Kolorimeter kann auch nach einigen Stunden, selbst am nächsten Tage ausgeführt werden. Die Farbe des abgekühlten Reaktionsgemisches ist sehr konstant und erhält sich sehr lange in unveränderter Stärke.

Ist der Kohlehydratgehalt des Organs so klein, daß in 1 ccm des Hydrolysatfiltrats weniger als 0,05 mg Glucose sich befinden, so muß man so verfahren, daß man statt 1 ccm 3½ ccm des Filtrats mit 7 ccm konzentrierter H_2SO_4 statt 9 ccm 77,5 vol.-proz. Säure unter starker Kühlung im fließenden Wasser oder besser Eis versetzt, im übrigen aber wie oben beschrieben verfährt. Die Standardlösung muß dann natürlich genau so behandelt werden.

Vergleich zwischen den Resultaten dieser Methode mit denen nach Neuberg-Löwi.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren erzielten Resultate verglichen wir in einigen Fällen mit den nach der *Neuberg-Löwi*schen Methode erhaltenen. Rattenlebern wurden gewogen, fein zerkleinert, etwa in 0,2 g des Gewebes wurde nach dem soeben beschriebenen Verfahren die Gesamtkohlehydrate bestimmt, der Rest der Leber wurde zu einer Gesamtkohlehydratbestimmung nach *Neuberg-Löwi* verwendet und das Reduktionsvermögen nach *Bertrand* bestimmt. Die nachfolgende Tabelle VII zeigt die nach beiden Methoden erhaltenen Werte für den Gesamtkohlehydratgehalt von Rattenlebern.

Tabelle VII.

Glykogengehalt von Rattenlebern in Prozenten des Feuchtgewichts.

Leber	Indolmethode Proz.	Methode von *Neuberg-Löwi* Proz.	Leber	Indolmethode Proz.	Methode von *Neuberg-Löwi* Proz.
1	1,53	1,59	3	1,98	2,16
2	2,60	2,82	4	2,14	2,23

Die nach unserer Methode bestimmten Werte sind in sämtlichen untersuchten Fällen um ein Geringes kleiner als die nach *Neuberg-Löwi* bestimmten. Der Unterschied beträgt bis zu 10 Proz. Diese Verschiedenheiten dürften zu einem Teil durch die Fehlerquellen beider Methoden bedingt sein. Zu einem aber auch sind sie dadurch zu erklären, daß, wie im Anfang dieses Abschnittes ausführlich dargelegt worden ist, in Organhydrolysaten außer Glucose sich noch andere Kohlehydrate befinden, deren Reduktionsvermögen ihrem Farbtiter bei der Indolschwefelsäurereaktion nicht parallel gehen muß. Vielleicht werden auch bei den Reduktionsmethoden einige Substanzen, die nicht kohlehydratartiger Natur sind, mitbestimmt.

IV. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Blute.

Wie in den Organen, kann man auch in den Körpersäften die Gesamtkohlehydrate nach dem hier beschriebenen kolorimetrischen Verfahren bestimmen. Im normalen Blute spielen neben der *Glucose* die übrigen Kohlehydrate eine geringe Rolle. In gewissen pathologischen Fällen, wie bei Diabetes und gewissen experimentell herbeigeführten Zuständen, wie z. B. bei *Eck*scher Fistel, erscheinen neben Glucose beträchtliche Mengen anderer Kohlehydrate, hauptsächlich *Glykogen* im Blute. Eine Methode also, die gestattet, die Gesamtkohlehydrate des Blutes zu bestimmen, ist von klinischem und experimentellem Interesse. *Die Bestimmung der freien Kohlehydrate im Blute kann ohne vorherige Hydrolyse mit HCl ausgeführt werden.* Wir haben nämlich gesehen, daß die komplexen Kohlehydrate mit Indol und Schwefelsäure ganz so reagieren, als ob die in ihnen enthaltenen Monohexosen frei wären. Man darf nur bei dem Enteiweißungsverfahren die komplexen Kohlehydrate nicht mitfällen. Man kann annehmen, daß nach Fällung der Eiweißkörper im Blute die in den Blutzellen befindlichen freien Kohlehydrate sehr rasch herausdiffundieren, besonders da die roten Blutkörperchen den größten Teil ihres Inhalts beim Lackfarbenwerden des Blutes bei Vermischen mit destilliertem Wasser an die umgebende Flüssigkeit abgeben. Es kämen also nur die freien Kohlehydrate der weißen Blutzellen und der Stromata der roten in Betracht.

Über den Kohlehydratgehalt der letzten finden sich keine Angaben in der Literatur. Er ist aber sicherlich nicht so groß, um neben den Kohlehydraten des Plasmas ins Gewicht zu fallen. Was die weißen Blutzellen betrifft, so gibt *de Haan*[1]) ihren Glykogengehalt beim Pferd mit 1 bis 3 Proz. des Feuchtgewichts an. Wenn wir das Gewicht der Leucocyten in 1 Liter Blut mit 1 g bemessen, so bedeutet das, daß der Glykogengehalt der Leucocyten etwa 1 bis 3 Proz. der Kohlehydrate des Plasmas ausmacht. Selbst für den Fall also, daß bei der Enteiweißung des Blutes

[1]) *de Haan*, diese Zeitschr. **128**, 124, 1922.

nicht sofort alles in den Leucocyten enthaltene Glykogen herausdiffundieren sollte, würde der nach unserem kolorimetrischen Verfahren gefundene Wert für die Kohlehydrate des Gesamtblutes nur in ganz unwesentlichem Maße von dem wirklichen abweichen. Nur in Fällen starker Leucocytose, z. B. bei Leucämie, wird es sich empfehlen, auch auf die Extraktion des Glykogens aus den weißen Blutzellen zu achten.

Da, wie wir noch weiter unten angeben werden, die Eiweißfällung mit Trichloressigsäure sich bei unserem Verfahren gut bewährt hat, kann man mit Sicherheit auf vollständige Extraktion des Glykogens aus den Blutzellen rechnen, wenn man das mit Trichloressigsäure gefällte Blut kurze Zeit stehen läßt. Wir haben uns durch besondere Versuche überzeugt, daß, wenn man zerriebene glykogenreiche Leber mit 5proz. Trichloressigsäure 12 Stunden stehen läßt, fast das ganze Glykogen in die umgebende Flüssigkeit hinausdiffundiert. Aus den einzelnen Blutzellen wird die Diffusion um so rascher vor sich gehen. Man muß also nur, wie oben erwähnt, zur Eiweißfällung ein Reagens benutzen, das die komplexen Kohlehydrate nicht fällt, um auch ohne Hydrolyse alle freien Kohlehydrate des Blutes bestimmen zu können.

Der auf diese Weise festgestellte Wert für den Kohlehydratgehalt im Blute dürfte natürlich mit dem nach Hydrolyse desselben Blutes ermittelten nicht identisch sein, denn zu dem letzteren tragen auch die aus Eiweißkörpern und etwa aus Nucleoproteiden frei gemachten Kohlehydrate ihren Teil bei. Aus den Darlegungen anfangs des vorigen Abschnitts ergibt sich indessen, daß diese Tatsache für die Eindeutigkeit der Befunde nur von Vorteil ist, denn der Farbtiter dieser Kohlehydrate bei der Indol-H_2SO_4-Reaktion ist von demjenigen des Glykogens und der Glucose vollkommen verschieden. In einem Gemisch dieser letzteren mit den ersteren resultiert ein Farbtiter, der die Gesamtmenge der Kohlehydrate nur annähernd angibt. Es muß hier übrigens darauf hingewiesen werden, daß neben diesen chemisch gebundenen Kohlehydraten auch noch solche vorkommen, deren Bindung an die Eiweißkörper des Blutes mehr lockerer Natur ist. Diese entsprechen wenigstens zum Teil dem sucre virtuel von *Lépine*; Versuche haben gezeigt, daß durch Stehenlassen von mit Alkohol gefälltem Blut während 24 bzw. 28 Stunden im alkoholischen Blutfiltrat beträchtlich mehr Kohlehydrate gefunden werden als es der Fall ist, wenn man das mit Alkohol gefällte Blut sofort filtriert. Ob diese Bindung des Zuckers am Bluteiweiß schon in vivo präexistiert oder ob sie erst im Moment der Eiweißfällung zustande kommt, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In der Literatur finden wir nur eine Angabe über die Bestimmung der freien Kohlehydrate des Blutes von *G. Caruso*[1]). Sie basiert auf der von *Rosenthal* und *Salkowski* beschriebenen Überführung der Kohlehydrate in Formaldehyd durch Kaliumpermanganat in saurer Lösung. Die Methode erscheint uns recht kompliziert.

Die sehr zahlreichen Methoden zur Bestimmung des Blutzuckers bestimmen *alle reduzierenden Substanzen* des Blutes, von den Kohle-

[1]) *Gaetano Caruso*, Ronas Berichte **10**, 512.

hydraten aber nur die Monohexosen. Im Laufe unserer Untersuchung ist von *Glassmann*[1]) ein Verfahren zur Bestimmung der Glucose im Blute veröffentlicht worden, das auf einer für die Glucose charakteristischen *Reaktion mit Resorcin und konzentrierter Salzsäure* beruht. Auch andere Kohlehydrate zeigen diese Reaktion mit Resorcin, ob sie sich aber auch zur Bestimmung etwa des Blutglykogens eignet, teilt *Glassmann* nicht mit. Bei diesem Verfahren muß die zu kolorimetrierende Lösung eine Temperatur von 60° besitzen, was eine nicht unerhebliche Komplikation des Verfahrens bedeutet.

Enteiweißung des Blutes für die Bestimmung der Kohlehydrate.

Der erste Schritt zur Bestimmung der Kohlehydrate im Plasma bzw. Serum nach der vorliegenden Methode bildet die *Enteiweißung* dieser Flüssigkeiten. Denn, abgesehen von der störenden Eigenfarbe des Blutes, enthalten die Bluteiweißkörper Kohlehydrate in chemischer oder vielleicht andersartiger lockerer Bindung. Wie schon oben erwähnt, läßt sich ein Teil dieser an Eiweiß gebundenen Kohlehydrate, z. B. durch Fällung mit Alkohol und längeres Stehenlassen mit dem letzteren aus den Bluteiweißkörpern extrahieren. *N. Polonowski* und *E. Duhot*[2]) haben dies nachgewiesen und den Vorgang *Glykapolyse* genannt. Der Begriff Blutzucker bzw. Kohlehydrate des Blutes, wie er den bisherigen Untersuchungen des Blutes zugrunde gelegt wurde, erscheint danach nicht ganz eindeutig definiert. *Polonowski* und *Duhot* ziehen, wie vor ihnen schon *Lépine*, den Schluß, daß nur solche Blutzuckerbestimmungen miteinander vergleichbar sind, bei denen ein gleiches Enteiweißungsverfahren und die gleichen Mittel zur Verhinderung der Gerinnung und der Glykolyse angewendet worden sind. Diesen Gesichtspunkt muß man stets im Auge behalten, wenn man an die Bestimmung der Kohlehydrate im Blute schreitet.

Für die hier beschriebene kolorimetrische Bestimmung mußte das hierbei verwendete Enteiweißungsverfahren zwei Eigenschaften besitzen. Es durfte erstens keine Kohlehydrate fällen, wie es z. B. der Alkohol tut, und durfte zweitens die Farbreaktion nicht stören. Diese Bedingungen sind bei der Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Metaphosphorsäure erfüllt.

Mit der *Trichloressigsäure* kann man die Enteiweißung so durchführen, daß man das mit einem mehrfachen Volumen Wasser versetzte Blut mit so viel 20proz. Trichloressigsäurelösung versetzt, daß die Schlußkonzentration dieser Säure im Gemisch 4,5 Proz. beträgt. Mit *Metaphosphorsäure* enteiweißt man in der Weise, daß man auf einen Teil

[1]) *Glassmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **150**, 16, 1925.
[2]) *Polonowski* und *Duhot*, Soc. de biol. **85**, 501.

Blut sieben Teile Wasser und zwei Teile 5proz. Metaphosphorsäure nimmt.

Bei der Enteiweißung mit Trichloressigsäure darf man nicht mehr verwenden als hier angegeben, da die fertigen Farbreaktionsgemische sonst nach Erkalten trüb werden. In konzentrierter H_2SO_4 trüben sich stärker konzentrierte Trichloressigsäurelösungen durch Entstehen eines fein kristallisierten Niederschlags, der zwar in der Wärme sich auflöst, aber nach dem Erkalten wieder erscheint. Die Metaphosphorsäure hat den Nachteil, daß sie sich schwerer im Wasser löst als die Trichloressigsäure und ihre Lösung nicht haltbar ist, sondern täglich frisch bereitet werden muß.

Von den übrigen Eiweißfällungsmitteln fällt der *Alkohol* bekanntlich die kolloidalen Kohlehydrate vollständig; dasselbe dürfte vom *kolloidalen Ferrihydroxyd*, von der *Gerbsäure* und *Phosphor*wolframsäure gelten. *Aceton*, *Sulfosalicylsäure* und *Kaliumquecksilberjodid* stören die Reaktion empfindlich durch Nebenfärbungen. Bei Verwendung von *Uranylacetat* wird der bei der Reaktion entstehenden braunen Farbe ein gelber Ton beigemischt, wodurch die Kolorimetrie unsicherer wird.

Bei der Filtration des gefällten Blutes muß man ebenfalls quantitative Filter verwenden, da die gewöhnlichen manchmal an das Filtrat Stoffe abgeben, die mit Indol einen braunen Farbstoff bilden.

Durch die oben beschriebenen Mischungsversuche ist gezeigt worden, daß die im Blute unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen vorkommenden Substanzen bei der Bestimmung der Kohlehydrate nicht stören können. Wir haben uns auch noch auf direktem Wege davon zu überzeugen gesucht, daß im Blute außer Kohlehydrat keine Substanzen vorkommen, die mit Indol und H_2SO_4 eine Farbe geben, indem wir die Kohlehydrate im Blute ausfällten.

Versuch mit Ausfällung der Kohlehydrate im Blute.

Zur Ausfällung der Kohlehydrate benutzten wir das von *van Slyke-Clausen* angewandte Verfahren mit Hilfe von Calcium und Kupferoxyd.

50 ccm Rinderblut, das mit Fluorid ungerinnbar gemacht wurde, wurden fünffach mit Wasser verdünnt und mit der gleichen Menge 5proz. Metaphosphorsäure gefällt, abfiltriert, das Filtrat wurde mit NaOH neutralisiert und mit $^1/_4$ Volumen 20proz. $CuSO_4$ versetzt und dann im Überschuß mit gepulvertem $Ca(OH)_2$ versetzt, bis die Lösung alkalisch und der Niederschlag tief blau war. Die Mischung wurde unter mehrmaligem Umrühren eine halbe Stunde stehengelassen. Der Niederschlag wurde abgenutscht, sodann wurde gasförmige CO_2 so lange eingeleitet, bis sich der anfänglich auftretende Niederschlag von $CaCO_3$ wieder löste. Die Lösung wurde einige Minuten gekocht, so daß fast das gesamte Ca als Carbonat ausfiel. Das geschah, um das Ca, das mit H_2SO_4 als Sulfat ausfallen und eine Trübung bewirken würde, zu entfernen. Nun wurde das Filtrat auf dem Wasserbad so weit eingeengt, daß das Endvolumen in bezug auf die festen Bestandteile dreimal stärker konzentriert war als das entsprechende Blut.

Es wurde mit dem so eingeengten Filtrat die Indol-H_2SO_4-Reaktion angesetzt. Die Farbe war gelbbraun und entsprach ungefähr 0,018 Proz. Glucose. Auf das ursprüngliche Volumen umgerechnet, gibt dieses vom Kohlehydrat befreite Blut eine Farbe, wie wenn es noch ungefähr 0,006 Proz. Glucose enthalten würde, also sicherlich nur einen sehr kleinen Bruchteil. Auf jeden Fall ist es so gering, daß es eine Kohlehydratbestimmung im Blute wohl nicht beeinflussen könnte.

Aus obigen Darlegungen ergibt sich folgender Vorgang als geeignet zur Bestimmung der gesamten Kohlehydrate im Blute.

Vorschrift für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Blute.

Zur Blutentnahme aus der Fingerbeere verwendet man ein mit einer gebogenen Kapillarpipette versehenes Kölbchen in der Art, wie die von *Weiss* für die *Bang*sche Blutzuckermethode angegebenen. Das Kölbchen besitzt eine Marke am Hals des Kölbchens, knapp oberhalb seiner Ansatzstelle und faßt bis zu dieser Marke 5 ccm. Die Marke befindet sich dicht oberhalb des Ansatzes des Halses an die Ausbauchung des Kölbchens. Vom langen Hals geht ein kurzer Tubus ab, der zum Ansaugen dient. Im Kölbchenhals steckt mit Hilfe eines Gummischlauches luftdicht eingefaßt eine winklig gebogene Glaskapillare. Sie ragt ins Kölbchen nur ganz wenig unter die Marke am Halse hinein. Der freie Schenkel der Kapillare trägt eine Marke. Von ihrem freien Ende bis zur Marke faßt die Kapillare 0,150 ccm.

Das Blut wird mit der Kapillare bis zur Marke angesogen, dann nach Absetzen der Kapillare von der Fingerbeere in das Kölbchen hineingesaugt und 2 bis 3 ccm destilliertes H_2O nachgezogen. Nun wird die Kapillare aus dem Kölbchenhals hinausgenommen, in das Kölbchen werden 1,2 ccm 20proz. Trichloressigsäure hinzugefügt und mit H_2O bis zur Marke aufgefüllt. Es wird nun nach Absetzen des Niederschlags durch ein kleines quantitatives Filter filtriert (*Schleicher* und *Schüll*-Blauband).

3½ ccm des wasserklaren Filtrats werden entnommen und in eine hohe, weite Eprouvette gebracht mit 7 ccm konzentrierter H_2SO_4 (spezifisches Gewicht 1,84) versetzt und in Eis oder fließendem Wasser vollkommen nach Vermischung abgekühlt. 0,3 ccm einer 1proz. alkoholischen Indollösung werden unter Kühlung zugesetzt. Nach gründlichem Vermischen wird in der gleichen Weise, wie wir es bei der Bestimmung in den Organen angegeben haben, 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, nachher abgekühlt und im Kolorimeter mit einer Standardlösung verglichen. Wegen der nach längerem Stehen sich bildenden Trichloressigsäureniederschläge empfiehlt es sich, kurze Zeit nach Beendigung des Erhitzens zu kolorimetrieren.

Die Standardlösung wird in der gleichen Weise, wie oben bei der Beschreibung der Gesamtkohlehydrate in Organen angegeben wurde, immer frisch durch Verdünnung einer alkoholischen, lange haltbaren Zuckerlösung bereitet. Die Standardlösung soll denselben Gehalt an Trichloressigsäure haben wie die zu untersuchenden Blutfiltrate. In Fällen, in denen keine zu starke Hyperglykämie zu erwarten ist, geht man zweckmäßig so vor, daß man eine Standardlösung wählt, die in 100 ccm 0,003 g Glucose enthält. Diese Konzentration entspricht einer Kohlehydratkonzentration von 0,1 Proz. im Blute. Selbstverständlich muß auch hier mit jeder Versuchsserie eine Standardlösung mitgekocht werden. Auch hier kann man nicht einfach aus dem abgelesenen Verhältnis der beiden Farbstärken die Konzentration des Blutfiltrats berechnen, sondern muß ebenso wie bei der Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen dieselbe Korrektur am abgelesenen Verhältnis der Farbstärken der Standardlösung und des Blutfiltrats anbringen, um das tatsächliche Verhältnis der Konzentrationen zu finden. Die Korrektur wird, wie oben angegeben, in der Weise vorgenommen, daß man von dem kolorimetrisch gefundenen Verhältnis 0,2 abzieht und die so erhaltene Zahl durch 0,8 dividiert. Die erhaltene Zahl gibt das tatsächliche Verhältnis der Konzentrationen an.

Beispiel einer Durchrechnung und Tabelle siehe Vorschrift für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in Organen, Teil III, S. 400.

Man kann natürlich auch in größeren Blutmengen die Bestimmung ausführen, auch hat man bei Verwendung von einem halben bis zu einem Kubikzentimeter Blut den Vorteil, daß die Konzentration der Blutfiltrate zwischen 0,015 bis 0,50 Proz. betragen kann, in welcher Breite die Kolorimetrie am genauesten durchzuführen ist.

Um uns über die Übereinstimmung der Werte, die die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate nach der angegebenen Methode liefert, mit den Werten zu überzeugen, die die bisher üblichen Blutzuckermethoden lieferten, haben wir die Resultate dieser Methode in einigen Fällen mit den nach der *Bang*schen Blutzuckermethode und nach der Methode von *Lewis Benedict* erzielten verglichen.

Vergleich der nach dieser Methode gefundenen Werte mit den Blutzuckerwerten von Bang und Benedict.

Der Vergleich mit der *Benedict*schen Methode[1]) wurde an Rindsblut ausgeführt, das mit Na Fl ungerinnbar gemacht wurde. Zur *Benedict*schen Methode wurden je 2 ccm Blut verwendet, während zur Indolreaktion 0,5 ccm Blut, das entsprechend verdünnt wurde, verwendet wurde.

---

[1]) *Lewis Benedict*, Journ. of biol. Chem. **20**, 61.

	Rusultate			Resultate	
	unserer Methode Proz.	nach *Benedict* Proz.		unserer Methode Proz.	nach *Benedict* Proz.
Blut I	0,118	0,112	Blut IV	0,097	0,093
„ II	0,098	0,092	Serum I	0,075	0,068
„ III	0,123	0,120			

Für den Vergleich mit der *Bang*schen Methode wurde Blut von gesunden nüchternen Personen verwendet, das aus der Fingerbeere entnommen wurde. Der Blutzucker wurde nach der Vorschrift nach *Bang* bestimmt, die Indolreaktion wie oben angegeben angesetzt.

	Resultate			Resultate	
	unserer Methode Proz.	nach *Bang* Proz.		unserer Methode Proz.	nach *Bang* Proz.
Blut I	0,117	0,096	Blut IV	0,098	0,095
„ II	0,108	0,092	„ V	0,132	0,104
„ III	0,120	0,099	„ VI	0,093	0,095

Es zeigt sich aus diesen Tabellen, daß ein gewisser Unterschied zwischen den Blutzuckerwerten und den Gesamtkohlehydratwerten nach dieser Methode besteht; er beträgt im Mittel etwa 0,010 bis 0,015 Proz. im Blute. Über die Frage, ob und welcher Unterschied in normalen und pathologischen Fällen zwischen dem Blutzuckergehalt und dem Gesamtkohlehydratgehalt des Blutes besteht, sind Untersuchungen im hiesigen Institut im Gange.

Benutzt man statt Trichloressigsäure *Alkohol* zum Enteiweißen des Blutes, so werden die etwa vorhandenen komplexen Kohlehydrate des Blutes gefällt. Im Filtrat bleiben dann nur Glucose und eventuell Disaccharide in Lösung.

Die Blutentnahme erfolgt genau so wie bei der Fällung mit Trichloressigsäure. Es werden mit demselben Kölbchen und derselben Kapillare, wie oben angegeben, 0,150 ccm Blut angesaugt und mit 88 proz. Alkohol nachgespült. Die Kapillare wird nun herausgenommen und es wird mit dem gleichen Alkohol auf 5 ccm aufgefüllt. Es wird durch ein quantitatives kleines Filter filtriert, 3½ ccm des Filtrats werden in einer Eprouvette unter scharfer Kühlung mit 6 ccm konzentrierter H_2SO_4 versetzt und 0,3 ccm einer 1 proz. alkoholischen Indollösung zugesetzt. Nach 10 Minuten langem Kochen am Wasserbad wird kolorimetriert. Die Konzentration des Standards soll auch in diesem Falle 0,003 Proz. an Glucose betragen, doch wird hier die Stammzuckerlösung mit Alkohol derart verdünnt, daß ihre Schlußkonzentration an Alkohol 86 Proz. beträgt.

V. Zusammenfassung.

1. In vorstehender Arbeit wurde versucht, eine Farbreaktion der Kohlehydrate, die vor vielen Jahren von *Fleig* und *Weekhuyzen* angegeben worden ist, als Prinzip einer Mikrobestimmungsmethode für diese

Körper auszuarbeiten. Die Reaktion beruht auf einer Färbung, die sämtliche Kohlehydrate geben, wenn man eine wässerige Lösung dieser Körper mit konzentrierter Salzsäure oder Schwefelsäure in Gegenwart von Indol oder Skatol erhitzt. Es tritt hierbei eine braune bzw. violette Farbe auf.

2. Die Reaktion Kohlehydrat — *konzentrierte Salzsäure* (spezifisches Gewicht 1,175) — *Skatol* ist ungeeignet, als Grundlage einer Bestimmungsmethode zu dienen, da die Farbstärke sich als der Kohlehydratkonzentration nicht proportional erwies. Die Farbintensität stieg nämlich stärker an, als es der Konzentration entsprach. Es zeigte sich dabei, daß Fructose und Verbindungen, in deren Molekül sie enthalten ist, wie Saccharose und Hexosediphosphorsäure, einen weitaus stärkeren Farbtiter besitzen als die entsprechende Glucosemenge. Die Farbintensität ist bei gleichkonzentrierten Proben nicht immer die gleiche, wahrscheinlich weil bei dem Erhitzen im Wasserbade, wie bei der Bestimmung notwendig, aus den verschiedenen Proben ungleichmäßig Chlorwasserstoff entweicht.

3. Bei Verwendung einer *verdünnteren Salzsäure*, als die eben angegebene, z. B. einer ungefähr 20 proz., zeigte sich, daß in entsprechender Verdünnung nur die Fructose, Saccharose und Hexosephosphorsäure eine violette Farbe geben. Die anderen Kohlehydrate geben erst in verhältnismäßig sehr hoher Konzentration, Glucose z. B. erst in 1proz. Lösung, eine ganz schwache Farbe. Diese Reaktion eignet sich zum Nachweis von Lävulose und ihren Verbindungen.

Diese Farbreaktion ist auch ein neuer Hinweis darauf, daß ein lävuloseartiger Komplex in der Hexosediphosphorsäure enthalten ist.

4. Die bei der Reaktion Kohlehydrat—*konzentrierte Salzsäure*—*Indol* auftretende mahagonibraune Farbe ist trotz einer annehmbaren Proportionalität ungeeignet, da infolge ungleichmäßigen Entweichens von Chlorwasserstoffgas Schwankungen bis zu 12 Proz. auftreten. Fructose hat einen dreimal so starken Farbtiter als Glucose.

Bei verdünnter HCl verschiebt sich dieses Verhältnis noch zugunsten der Fructose; bei 10 proz. HCl gibt Glucose überhaupt keine Farbe mehr.

5. Die Reaktion Kohlehydrat—*Schwefelsäure*—*Indol* erweist sich als die geeignetste, als Prinzip einer Kohlehydratbestimmungsmethode zu dienen. Die optimale Säurekonzentration ist die Verwendung von 9 ccm einer 77,5 vol.-proz. H_2SO_4 auf 1 ccm wässerige Kohlehydratlösung. Die Farbe ist in diesem Falle rein braun. Bei Verwendung von stärker konzentrierter H_2SO_4 bekommen die konzentrierten Kohlehydratlösungen einen mehr rötlichen Stich, der die Kolorimetrie stark stört.

In dieser Versuchsanordnung geben Glucose und Galaktose ***denselben*** Farbtiter, Fructose einen um 12 Proz. höheren. Ebenso geben

die Polysaccharide dieselbe Farbstärke wie die gleiche Menge Monosaccharide, die in ihnen enthalten ist. Es erübrigt sich somit eine Hydrolyse zur Überführung der Polysaccharide in Monosaccharide, wie es bisher bei Gesamtkohlehydratbestimmungsmethoden notwendig war. Methylglucosid und Hexosediphosphorsäure geben denselben Wert, wie wenn das Hexosemolekül in ihnen frei wäre.

Verschiedene andere kohlehydratartige Substanzen, ebenso Eiweißkörper und Nucleinsäuren geben verschiedene Farben, deren genauere Untersuchung noch aussteht.

6. Die *Spezifität der Reaktion* für Kohlehydrate ist keine absolute, vielmehr geben auch verschiedene andere organische Substanzen in mehrprozentigen Lösungen Farben, die den braunen Farben der Kohlehydrate bei der Indol-H_2SO_4-Reaktion ähnlich sind. Doch treten die Farben dieser Körper erst bei so hohen Konzentrationen auf, daß sie die Bestimmung der Kohlehydrate in Organen und Körpersäften nicht wesentlich stören können. Außerdem wurde durch Mischungsversuche von Glucose mit Alanin, Casein, Caseinhydrolysat, Aceton und mit Mischungen mehrerer Substanzen, im Verhältnis wie sie im Blute unter normalen und pathologischen Verhältnissen enthalten sind, bewiesen, daß die Farben dieser Körper die Bestimmung der Kohlehydrate nicht stören können, vielmehr tritt bei Gegenwart von Glucose die Farbe dieser Körper derart in den Hintergrund, daß die Mischungen eine Farbe liefern, wie wenn sie reine Glucose wären.

7. Die Indol-H_2SO_4-Reaktion vollzieht sich auch in *alkoholischer* Lösung. Nur muß man eine etwas verdünntere Schwefelsäure verwenden. Bei Verwendung von stärker konzentrierter H_2SO_4 tritt in Gegenwart von Kohlehydrat eine rein rote Farbe auf. Die Reaktion in alkoholischer Lösung ist ein Weg, um Monosaccharide und Disaccharide getrennt von den Polysacchariden bestimmen zu können, da die Polysaccharide, wie z. B. das Glykogen, in Alkohol unlöslich sind.

8. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der *Gesamtkohlehydrate in Organen* nach einer vorherigen zweistündigen Hydrolyse mit 2,2 proz. HCl. Eine Eiweiß- oder Peptonfällung kann, wie durch Versuche bewiesen wurde, entfallen. Ein Vergleich der durch diese Methode erzielten Resultate mit denen nach *Neuberg-Löwi* zeigte, daß beide Methoden ungefähr dieselben Werte liefern.

9. Im *Blute* ist die Bestimmung der *Gesamtkohlehydrate* (nach einer Eiweißfällung mit Trichloressigsäure) ohne Hydrolyse möglich. Man benutzt zu einer Bestimmung 0,15 ccm Blut. Bei einem Versuch mit Ausfällung der Kohlehydrate im Blute mit Kupfer-Kalk zeigt sich, daß danach eine Restfarbe im Werte von höchstens 6 Proz. des Blutzuckerwertes verblieb. Bei einem Vergleich der Werte für Gesamtkohlehydrate

nach dieser Methode mit den Blutzuckerwerten nach *Bang* und *L. Benedict* zeigte sich, daß die Gesamtkohlehydratwerte nach unserer Methode meist etwas höher sind als die entsprechenden Blutzuckerwerte.

10. Zusammenfassend ist zu sagen, daß die angegebene Methode es ermöglicht, die *Gesamtkohlehydrate in physiologischen Flüssigkeiten mit Hilfe einer Farbenreaktion und nicht auf Grund ihres Reduktionsvermögens zu bestimmen.* Die Konzentrationsbreite, in der die Bestimmung möglich ist, erstreckt sich zwischen 0,1 bis 0,0015 Proz. In absoluten Zahlen ist die geringste Menge Kohlehydrat, die noch genau bestimmt werden kann, 0,05 mg.

Über das glykolytische Vermögen tierischer Organe beim Carcinom.

Von

Zacharias Dische und **Daniel Laszlo.**

Ausgeführt mit Unterstützung der *Seegen*-Stiftung der Akademie der Wissenschaften in Wien.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhalt.

Seite

I. Fragestellung und Wahl der Methodik 413

II. Versuche, in denen die Gewebsglykolyse vermittelst des Kohlehydratabbaues in dem Gewebe und ihm zugesetzten „Ringer" festgestellt wurde 415

A. Methodik 415

1. Ernährung der Tiere, Impfung und Entwicklung des Carcinoms 415
2. Entnahme, Wägung und Zerkleinerung des Gewebes . . . 416
3. Einleitung des Gasgemenges in die mit „Ringer" und Gewebsbrei beschickten Gefäße, Schüttelung im Brutofen . 418
4. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in der Portion a . 419
5. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in der Portion b . 419
6. Zusammensetzung des für die Glykolysenversuche verwendeten „Ringers". 420

B. Versuchsergebnisse 421

a) Erklärung zu den Tabellen 421
b) Abbau der Gesamtkohlehydrate durch Carcinom- und Lebergewebe von *normal ernährten* Carcinomtieren und Lebergeweben von gesunden Tieren 423
c) Versuche über den Kohlehydratabbau durch Lebern *hungernder* Normal- und Carcinomtiere 425
d) *Zeitpunkt* des Auftretens des vermehrten Kohlehydratabbaues durch die Leber beim Carcinom 426
e) Versuche über den Kohlehydratabbau durch *Nieren* normaler und Carcinomtiere 427

III. Versuche, in denen die Glykolyse durch Messung des Glucoseschwunds aus der „Ringerlösung" ermittelt wurde Seite 428
A. Methodik 428
B. Versuchsergebnisse 431
a) Glykolyse durch *Carcinom-* und *Leber*gewebe von *Tumortieren* und *Leber*geweben von *gesunden* Tieren 431
b) Versuche über die Glykolyse durch *Nierengewebe* von gesunden und Carcinomtieren 434
IV. Diskussion der Resultate 434
Versuchstabellen 439
Zusammenfassung 448

I. Fragestellung und Wahl der Methodik.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch eine zufällige Beobachtung veranlaßt, die wir bei einer Arbeit über die Glykolyse des Carcinomgewebes unter besonderen Bedingungen gemacht haben. Bei dieser Arbeit erhielten wir für die Glykolyse des Carcinoms erheblich geringere Werte, als *Warburg*[1]) und seine Mitarbeiter in ihren Arbeiten über diesen Gegenstand immer wieder ermittelt haben. Es war anzunehmen, daß die Ursache dieser Verschiedenheit darauf zurückzuführen sei, daß wir ein weit gröberes Verfahren als diese Autoren zur Bestimmung der Glykolyse angewendet haben. Um diese Annahme zu prüfen, haben wir die Glykolyse der metastasenfreien Leber desselben Tieres gemessen, von dem das Carcinom herstammte, dessen glykolytische Fähigkeit zugleich geprüft wurde. *Warburg, Posener* und *Negelein*[2]) geben an, daß das Carcinomgewebe im zuckerhaltigen „Ringer" zehnmal stärker glykolysiert als die Leber. Wenn nun die nach unserer Methode erhaltenen absoluten Werte für die Carcinomglykolyse beträchtlich kleiner sind als die von den genannten Autoren angegebenen, so mußte doch erwartet werden, daß das Verhältnis der Glykolyse beider Gewebsarten zueinander auch nach dieser Methode annähernd von der gleichen Größenordnung sein würde.

Zu unserem Erstaunen fand sich nichts dergleichen; wir sahen vielmehr in einer ganzen Reihe von Versuchen, daß *die Leber* des Carcinomtieres eine *Glykolyse von ungefähr derselben Größenordnung wie das Carcinomgewebe selbst* zeigte. Es erschien uns nicht plausibel anzunehmen, daß diese Diskrepanz darauf zurückzuführen sei, daß wir für unsere Versuche Carcinom und Leber von Mäusen verwendeten, während die anderen Autoren diese Gewebe Ratten entnommen hatten. Noch weniger Grund hatten wir, die Resultate *Warburgs* und seiner Mitarbeiter anzuzweifeln. Wir dachten vielmehr, daß die Diskrepanz daher stammen könnte, daß die Werte, die die genannten Autoren für die Glykolyse der Leber angeben, sich auf die *normale Leber normaler*

[1]) *O. Warburg* und *S. Minami*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.
[2]) *Warburg, Posener* und *Negelein*, ebendaselbst **152**, 309, 1924.

Tiere beziehen, während wir mit *Lebern von Carcinomtieren* gearbeitet haben. So entstand die Frage: *Unterscheidet sich das glykolytische Vermögen der an sich carcinomfreien Organe von Carcinomtieren von denjenigen normaler Tiere?*

Die weiter unten mitgeteilten Versuche wurden zu dem Zwecke ausgeführt, um eine klare und eindeutige Antwort auf diese Fragestellung zu erhalten. Aus äußeren Gründen haben wir von den Organen bisher nur die Leber und die Niere von Carcinomtieren und von Normaltieren auf ihr glykolytisches Vermögen geprüft und mußten die Untersuchung anderer Organe auf einen späteren Zeitpunkt verschieben.

Was die Wahl der zur Verwendung gelangenden Methode betrifft, so wäre es am naheliegendsten gewesen, auf die von *Warburg*[1]) *ausgearbeitete Methode zurückzugreifen.* Diese erlaubt die Messung der Gewebsglykolyse in sehr exakter Weise; denn einerseits bleibt die Vitalität des Gewebes bei diesem Verfahren auch bei längerer Versuchsdauer gut erhalten, und der Stoffaustausch zwischen dem Gewebe und dem es umspülenden Medium erfolgt ungefähr mit derselben Geschwindigkeit, wie es in vivo der Fall ist. Andererseits wird bei diesem Verfahren die Menge der bei der Glykolyse gebildeten Milchsäure indirekt auf dem Wege der manometrischen Messung des durch sie aus dem „Ringer" ausgetriebenen CO_2 ermittelt. Dadurch wird es möglich, den Abbau so kleiner Mengen von Glucose nachzuweisen, daß die Versuchsdauer auf eine halbe bis eine Stunde eingeschränkt und so die Möglichkeit der Vortäuschung einer Glykolyse durch interkurrierende bakterielle Zersetzungen ausgeschaltet werden kann.

Bei aller Exaktheit hat indessen die *Warburg*sche Methode den Nachteil, daß die Größe der Glykolyse nur auf indirektem Wege ermittelt wird und daß von Fall zu Fall erst auf chemischem Wege nachgewiesen werden muß, daß *der aus dem „Ringer" ausgetriebenen Kohlensäure eine äquivalente Menge verschwundenen Zuckers entspricht.* Es kann ja sowohl Kohlensäure aus anderen Stoffen nicht kohlehydratartiger Natur entstehen, wie auch Kohlehydrate auf einem anderen Wege wie auf dem der Milchsäurebildung abgebaut werden. Auch muß man bedenken, daß bei manchen Organen kleiner Tiere, wie z. B. der Niere einer Maus, die Anfertigung feiner Schnitte aus freier Hand schwierig ist.

Auf Grund dieser Überlegung suchten wir nach einer allgemeiner verwendbaren, einfacheren, wenn auch eventuell weniger genauen Methode zur Messung der Glykolyse von Organen, wobei die Glykolyse möglichst aus dem Schwund des Traubenzuckers ermittelt werden sollte. Nun geben die meisten tierischen Organe beim Stehen im Brut-

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.

ofen in Ringerlösung an dieselbe Glucose und andere Kohlehydrate ab. Wollte man also die Glykolyse aus dem Schwund des Traubenzuckers in dem das Gewebe umspülenden „Ringer" errechnen, so müßte man neben Bestimmung des Traubenzuckers im „*Ringer*" auch Kohlehydratbestimmungen am Anfang und am Ende des Versuchs im *Gewebe* ausführen, um die Menge der Glucose festzustellen, die aus dem Gewebe in den „Ringer" neu hinzugekommen ist. Um die Bestimmung nicht so kompliziert zu gestalten, wählten wir einen anderen Weg für die Ermittlung der Glykolyse. Wir bestimmten die *Gesamtkohlehydrate*, die sich in dem zum Glykolyseversuch verwendeten Gewebsbrei und in dem ihm zugesetzten zuckerhaltigen „Ringer" am Anfang und am Ende des Versuchs befanden. Die Differenz dieser beiden Größen ergab die Menge der durch die Glykolyse des Gewebsbreies abgebauten Kohlehydrate. Die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate erfolgte nach einer zu diesem Zwecke von dem einen von uns *(Z. Dische)* zusammen mit *Hans Popper*[1]) ausgearbeiteten Methode. Diese erlaubt die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in 0,1 bis 0,2 g Gewebe mit einer für die vorliegende Untersuchung ausreichenden Genauigkeit. Es ist klar, daß der auf diese Weise gemessene Abbau der Kohlehydrate nicht notwendig dem Abbau des Traubenzuckers, also der eigentlichen Glykolyse, gleichgesetzt werden muß; die Zellen könnten ja ihr eigenes Glykogen direkt angreifen, was z. B. für Embryonalzellen von *E. Negelein*[2]) nachgewiesen worden ist. Deshalb haben wir noch eine zweite Reihe von Versuchen ausgeführt, in der wir die Abnahme der *Glucose* in dem das Gewebe umspülenden „Ringer" während des Aufenthalts im Brutofen gemessen haben. Gegen das in der letzteren Versuchsreihe benutzte Verfahren lassen sich manche Einwände erheben. Da aber die dabei erhaltenen Resultate im großen und ganzen mit den nach der ersteren Methode gewonnenen übereinstimmen, so kann man sie als einigermaßen verläßlich betrachten. Da sich die beiden Versuchsreihen gegenseitig stützen und ihre Beweiskraft heben, teilen wir auch die zweite Versuchsreihe und die damit gewonnenen Resultate im nachfolgenden mit.

II. Versuche, in denen die Gewebsglykolyse vermittelst des Gesamtkohlehydratabbaues in dem Gewebe und ihm zugesetzten „Ringer" festgestellt wurde.

A. Methodik.

1. Ernährung der Tiere, Impfung und Entwicklung des Carcinoms.

In dieser ersten Versuchsreihe haben wir den Kohlehydratabbau durch Leber und Niere normaler und Carcinommäuse in einer Anzahl von

[1]) *Z. Dische* und *H. Popper*, diese Zeitschr. **175**, 371, 1926.
[2]) *Negelein*, diese Zeitschr. **158**, 121, 1925.

Fällen gemessen. Den Carcinomstamm erhielten wir aus dem Institut für experimentelle Pathologie in Wien; es stammte aus dem Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt am Main.

Wir *überimpften* den Tumor auf die Weise, daß wir aus ihm unter aseptischen Kautelen kleine, nicht nekrotische Stücke entnahmen, mit einer kleinen Schere in einem sterilen Glasgefäß fein zerkleinerten und zu dem so erhaltenen Gewebsbrei etwas sterile physiologische NaCl-Lösung hinzufügten. Die dadurch entstandene Gewebssuspension wurde in eine kleine Rekordspritze aufgezogen und mit einer dicken (Serum-) Nadel injiziert. Wir gingen dabei so vor, daß die Nadel an der Ferse in das Grübchen hinter der Achillessehne eingestochen und entlang der Schenkelmuskulatur in die äußere Beckenmuskulatur fast bis zur Wirbelsäule vorgeschoben, hierauf 0,1 bis 0,2 ccm der Tumorsuspension injiziert wurde. Die geimpften Tiere lebten unter denselben Bedingungen wie die nichtgeimpften, sie wurden mit aufgeweichtem Brot, gekochtem Reis und Hafer ernährt. Die Tumoren entwickelten sich in sämtlichen Impfgenerationen, bis auf die letzte, sehr rasch und gingen in 100 Proz. der Fälle an. Nach einer Woche waren die Tumoren etwa erbsengroß, nach etwa 10 bis 12 Tagen waren sie von außen zu sehen, begannen sehr rasch zu wachsen, durchwuchsen die ganze Schenkel- und Beckenmuskulatur und brachen oft in die Bauchhöhle ein. Die Tiere schleppten das Bein auf der Impfseite nach, ihr Verhalten war weniger lebhaft als das der normalen Tiere. Ein Teil ging schon in der dritten Woche ein, der Rest im Laufe der vierten Woche. *Metastasen* fanden sich nur sehr selten. Die letzte Impfgeneration, die auf für die letzten Versuche verwendeten Tiere verimpft wurde, zeigte ein geringeres Wachstum und Malignität. Die Tumoren dieser Generation erreichten höchstens Bohnengröße, blieben aber oft viel kleiner, die geimpften Tiere behielten viel länger ihre Lebhaftigkeit und überlebten oft die vierte Woche.

2. Entnahme, Wägung und Zerkleinerung des Gewebes.

Da die Versuchsdauer 1 bis 2 Stunden betrug, haben wir auf Wahrung der Sterilität bei allen Manipulationen verzichtet. Wir nahmen an und fanden es später durch den Ausfall der Versuche bestätigt, daß in so kurzer Zeit keine ins Gewicht fallenden bakteriellen Zersetzungen stattfinden. Für die Bestimmung der Gesamtkohlehydrate im Gewebsbrei und dem ihm zugesetzten „Ringer" vor Beginn und nach Ablauf des Aufenthalts im Brutofen reichten eine Leber bzw. beide Nieren einer Maus aus. Das betreffende Tier wurde durch Scherenschlag geköpft und ausbluten gelassen. Dabei floß etwa 0,4 bis 0,5 ccm Blut aus. Nun wurde das Carcinom oder das Organ, an dem die Messung der Glykolyse vorgenommen werden sollte, entnommen, wobei besonders darauf geachtet wurde, den Darm nicht zu verletzen und nicht eine Infektion durch Darminhalt herbeizuführen. Das Gewebe wurde in ein vorher gewogenes *Glasgefäß* gebracht, in welchem es zerkleinert, gewogen wurde und während der ganzen Versuchsdauer verblieb. Da die meisten Versuche in einer Atmosphäre von Stickstoff + 5 Vol.-Proz. CO_2 angesetzt wurden, waren die Glasgefäße so eingerichtet, daß das Gasgemisch zu- und abgeleitet werden konnte, und das Gefäß während der ganzen Versuchsdauer gasdicht abgeschlossen blieb. Abb. 1

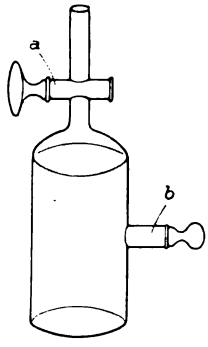


Abb. 1.

zeigt die Form eines Wägegläschens von etwa 20 ccm Fassungsraum. Der eingeschliffene Deckel des Gläschens ist mit einem Ansatzrohr *a* versehen, in dem sich ein Glashahn befindet. In etwa der halben Höhe der Seitenwand dieses Gläschens befindet sich ein mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel verschließbarer Tubus *b*. Der Tubus ist nicht konisch, sondern zylindrisch. Der Glasstöpsel reicht so tief in den Tubus hinein, daß sich zwischen seinem freien Ende und der Seitenwand des Gefäßes kein freier Raum befindet. In diesen freien Raum könnten während der Schüttelung der Gewebssuspension im Brutofen Gewebspartikeln gelangen und liegen bleiben. Das zum Glykolysenversuch verwendete Organ wurde in dem Gefäß mit einer kleinen Schere so fein zerkleinert, daß es makroskopisch einem homogenen Brei glich. Bei diesem Modus der Zerteilung dürfte das Gewebe nicht so stark geschädigt werden, wie es beim Zerreiben der Fall wäre. Wenn sich später beim Suspendieren des Gewebes im „Ringer" zeigte, daß einzelne gröbere Gewebsbröckel in dem Brei noch vorhanden waren, wurden sie mit einer feinen Schere zerteilt, die Schere mit destilliertem Wasser abgespült und das Spülwasser nach Beendigung des Versuchs mit der „Ringer"-Gewebssuspension vereinigt.

Nach der Zerkleinerung wurde das Gefäß samt Inhalt auf 1 mg genau *gewogen* und durch Subtraktion des bekannten Leergewichts aus dem so gefundenen Gewicht das Gewicht des Gewebes festgestellt. Der Gewebsbrei wurde nun mit einem feinen Glasspatel gut umgerührt, ein Teil mit dem Spatel herausgenommen und in eine Porzellanreibschale überführt, welche wir weiter unten als *Portion a* bezeichnen. Diese Portion diente zur Bestimmung der *Kohlehydratmenge im Gewebsbrei bei Beginn des Versuchs.* Der Spatel wurde nicht weiter benutzt, sondern gleichfalls in der Reibschale gelassen. Nun wurde das Gefäß mit dem darin verbliebenen Rest des Gewebsbreies noch einmal gewogen und durch Subtraktion dieses letzten Gewichts von dem vorigen das Gewicht der in die Reibschale übergeführten bzw. an dem Glasspatel haftengebliebenen Gewebsmenge bestimmt. In einzelnen Versuchen wurde der nach dieser Teilung verbliebene Gewebsteil nochmals geteilt, um Material für einen Parallelversuch zu gewinnen. Dabei gingen wir so vor, daß wir neuerdings mit einem Glasspatel einen Teil des Gewebsbreies herausnahmen, in ein leeres Schüttelgefäß überführten und das Gewicht jeder einzelnen Gewebsportion durch Subtraktion des Leergewichts des betreffenden Gefäßes von dem Gewicht des betreffenden Gefäßes + darin enthaltener Gewebsportion feststellten. Nach der Teilung des Organ- bzw. Carcinombreies wurden die in den Schüttelgefäßen befindlichen Gewebsportionen mit einer weiter unten zu besprechenden „Ringer"-Lösung versetzt, und zwar mit etwa acht- bis zwölfmal so viel in Kubikzentimetern, als das Gewicht der betreffenden Gewebsportion betrug. Die Teilungen des Gewebsbreies in die einzelnen Portionen wurden so vorgenommen, daß die Portionen ungefähr dasselbe Gewicht hatten. In dem größten Teile der Versuche wurde dieselbe „Ringer"-Menge auch der in der Porzellanreibschale abgeteilten Gewebsportion zugesetzt. *Dies geschah jedoch erst, nachdem die Gewebsportionen in den Glasgefäßen sich im Brutofen befanden und der Glykolyseversuch schon im Gange war. Diese Probe diente nämlich zur Bestimmung der Anfangskonzentration der Gesamtkohlehydrate in dem System Gewebe und ihm zugesetzte „Ringer"-Lösung.* Die ganze Manipulation von der Entnahme des Organs aus dem Tierkörper bis zum Versetzen des Gewebsbreies in den Schüttelgefäßen mit „Ringer" dauerte 15 bis 20 Minuten, je nach der Anzahl der vorgenommenen Teilungen.

3. Einleitung des Gasgemenges in die mit Gewebsbrei und „Ringer" beschickten Schüttelgefäße, Schüttelung im Brutofen.

Nach Zusatz der „Ringerlösung" wurde das verschlossene Gefäß vorsichtig mehrmals umgeschwenkt, um eine gleichmäßige Suspension des Gewebsbreies in der Flüssigkeit zu erzielen. Dann wurde ein *Gemisch von Stickstoff und 5 Vol.-Proz.* CO_2 in das Gefäß eingeleitet, das Gasgemenge etwa eine ½ Minute durch das Rohr *a* zu- und dem Tubus *b* abgeleitet, dann zuerst der Tubus *b*, nachher der Hahn *a* bei andauernder Gaszuleitung geschlossen. Der in der Stahlbombe bezogene Stickstoff enthielt nach Angabe der Fabrik 1 bis 2 Vol.-Proz. Sauerstoff. Unsere Versuche wurden also nicht bei ganz vollständiger Anoxybiose ausgeführt.

Nachdem die Gefäße mit dem Gasgemenge gefüllt waren, kamen sie in den Brutschrank, dessen Temperatur sich konstant auf 39° C hielt. Während der ganzen Versuchsdauer wurden sie mit Hilfe eines gleich zu beschreibenden *Schüttelapparats* mit 50 bis 60 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Umdrehungszahl reichte gerade aus, um die Gewebssuspension regelmäßig umzurühren, ohne daß infolge von zu heftigen Umdrehungen die Gewebsteilchen an die Wand des Gefäßes oder gegeneinander stark hingeschleudert worden wären. Die beiliegende Skizze veranschaulicht die Konstruktion des Schüttelapparats. Abb. 2: *a* ist eine drehbare metallene Achse, die durch eine in der Decke eines jeden Brutschranks befindliche Öffnung hindurchgeht und mit ihren zugespitzten unteren Enden in einem an den Boden des Brutschranks angeschraubten Widerlager ruht. Die Achse besteht aus zwei Teilen, einem soliden unteren und hohlen oberen Teil, die ineinandergeschraubt sind. An dem hohlen oberen Teile sind zwei Ansatzröhren angebracht, von denen sich die eine außerhalb, die andere innerhalb des Brutschranks befindet. Diese zwei Röhren können zur Zu- und Ableitung von Gasen von außen in den Brutschrank durch die hohle Achse hindurch dienen. Die zu schüttelnden Gefäße wurden mit Hilfe von Klammern, wie sie bei Universalstativen gebräuchlich sind, an der Achse befestigt. Die Stärke der Schüttelung kann bei gleichbleibender Umdrehungsgeschwindigkeit der Achse durch Verstellen der Klammern in bezug auf die Achse reguliert werden. Die die Achse in Bewegung haltende Apparatur befindet sich zur Gänze außerhalb des Brutschranks. Die Bewegungen einer Motorwelle *b* werden mit Hilfe einer Treibschnur auf eine Schnurscheibe *c*, von dieser durch eine gekreuzte Treibschnur auf ein um eine Vertikalachse drehbares Exzenterrad *d* übertragen. Von dem Exzenterrad geht eine Eisenleiste *e* aus; diese dient

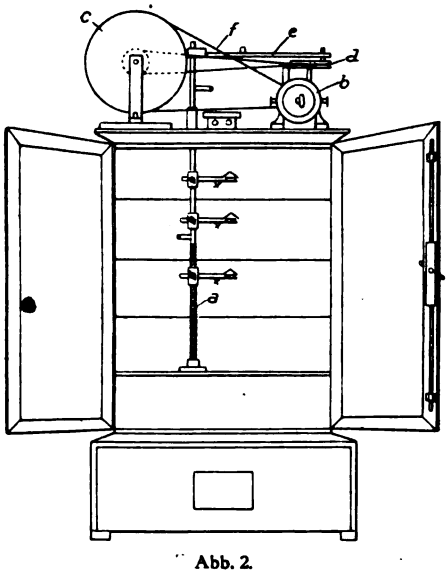


Abb. 2.

zur Übertragung der Bewegungen des Exzenterrades auf die Achse *a*. Das geschieht auf die Weise, daß das Ende der Eisenleiste *e* mit einer vom oberen Ende der Achse *a* ausgehenden Eisenleiste *f* drehbar durch Schrauben verbunden ist. Die Eisenleiste *f* besitzt in verschiedener Entfernung von der Achse *a* Schraubengewinde, in die die Schraube der Leiste *e* hineingeschraubt werden kann. Dadurch kann die Umdrehungszahl der Achse *a* reguliert werden.

4. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in der Portion a.

Nachdem die Schüttelgefäße mit der Gewebsbreisuspension in den Brutofen gelangt waren, wurde die in der Porzellanschale abgeteilte Gewebsportion a weiter verarbeitet. In dem größten Teile der Versuche wurde zu ihr dieselbe Menge „Ringer" zugesetzt wie zu den Gewebsportionen, die für die Glykolysenversuche verwendet wurden. Diese Gewebsportion diente zur Feststellung der *Kohlehydratkonzentration in dem System Gewebsbrei und zugesetztem „Ringer" bei Beginn des Versuchs*. Wir können nämlich annehmen, daß jede Portion des umgerührten Gewebsbreies den gleichen Gehalt an Gesamtkohlehydraten besaß. Wir haben uns davon durch besondere Versuche in der Weise überzeugt, daß wir eine zu Brei zerkleinerte Mäuseleber nach gründlichem Umrühren in zwei Portionen teilten und in beiden Portionen sofort den Gesamtkohlehydratgehalt in der weiter unten zu besprechenden Weise bestimmten. Die aus den einzelnen Portionen einer Leber ermittelten Kohlehydratgehalte der Lebern wichen in drei Fällen um höchstens 3 Proz. voneinander ab. Es ergibt sich daraus, daß der Gesamtkohlehydratgehalt der in der Porzellanschale abgeteilten Portion auf 3 Proz. genau dem Kohlehydratgehalt der für den Glykolysenversuch verwendeten Gewebsportion gleicht.

Nach Zusatz des „Ringers" wurde der Gewebsbrei der Portion a mit einem kleinen Pistill fein zerrieben, wobei darauf geachtet wurde, die bei der Teilung des Gewebsbreies an dem Glasspatel haftengebliebenen Gewebspartikeln restlos von demselben abzustreifen. Nach dem Zerreiben wurde die Suspension des Gewebsbreies im „Ringer" in eine trockene Eprouvette derart übergegossen, daß nur einzelne Gewebspartikelchen in der Porzellanschale zurückblieben. Nun wurde eine der „Ringermenge" gleiche Menge destillierten Wassers in die Reibschale hineinpipettiert, die Reibschale, das Pistill und der Glasspatel damit nachgewaschen und diese Waschlüssigkeit zu der Eprouvette mit dem zerriebenen Gewebe so hineingegossen, daß an der Wand der Eprouvette etwa haftende Gewebsteilchen dabei heruntergespült wurden. Diese Prozedur wurde noch einmal wiederholt. Sodann setzten wir so viel 10proz. HCl in die Eprouvette hinzu, daß deren Konzentration in der Flüssigkeit 2,2 Proz. HCl betrug und schüttelten vorsichtig um. Durch den Säurezusatz gerann das Gewebe und jegliche spontane Glykolyse in der Probe a war ausgeschlossen. Nach Zusatz der Säure wurde die Probe vorläufig stehengelassen, und die nun folgende letzte Phase der Kohlehydratbestimmung erfolgte für die Probe a und b gleichzeitig.

5. Bestimmung der Gesamtkohlehydrate in der Portion b.

Nachdem der Glykolysenversuch beendet war, wurde die Gewebssuspension in dem „Ringer" aus dem Glasgefäß, das im Brutofen geschüttelt worden war, in eine Porzellanschale hinübergegossen, sofort so viel de-

stilliertes Wasser, wie „Ringer" im Schüttelgefäß vorhanden war, in dasselbe hinpipettiert. Das Wasser lief so aus der Pipette ab, daß die Schliffflächen des Glasgefäßes abgespült wurden. Nun wurde der eingeschliffene Deckel auf das Schüttelgefäß aufgesetzt, der Hahn geschlossen und die Wände des Gefäßes nachgewaschen. Das in der Reibschale befindliche Gewebe wurde nun wie die Portion a zerrieben und die ganze Prozedur des zweimaligen Nachwaschens der Reibschale und des Pistills genau, wie dort angegeben, durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, daß das zweimalige Nachwaschen der Reibschale mit *dem Wasser* geschah, das vorher jedesmal zum Nachwaschen des Schüttelgefäßes benutzt worden war. Nachdem auch zu dieser Portion HCl genau wie oben angegeben zugefügt worden war, wurden die Eprouvetten mit beiden Gewebsportionen mit je einem Glaswollebausch verschlossen. Sie kamen beide für 2 Stunden in ein Wasserbad von 90° C. Die weitere Bestimmung erfolgte nach der von *Dische* und *Popper* angegebenen Vorschrift.

6. Zusammensetzung des für die Glykolysenversuche verwendeten „Ringers".

Die von uns benutzte „Ringerlösung" wurde so bereitet, daß auf 76 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung 2 ccm einer 1,14proz. KCl-, 2 ccm einer 1,16proz. $CaCl_2$- und 20 ccm einer 1,31proz. $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt wurden. Dazu enthielt sie in den meisten Versuchen 0,1 Proz. Glucose, in einigen Versuchen 0,092 bzw. 0,184 Proz. Glucose. Nach *Warburg, Posener* und *Negelein*[1]) steigt die Glykolyse mit der Glucosekonzentration bis zu etwa 0,1 Proz. stark an, von da an wird der Anstieg kleiner, so daß etwa bei 0,3 Proz. Glucose die Glykolyse ihr Maximum erreicht hat. Offenbar wäre es wenig zweckmäßig gewesen, die Glucosekonzentration über 0,1 Proz. zu steigern, da die Glykolyse dadurch nur wenig gesteigert und die prozentuellen Ausschläge durch die Erhöhung des Anfangsgehalts an Kohlehydraten im System Gewebsbrei und „Ringer" vermindert worden wären.

Die Wasserstoffionenkonzentration unseres „Ringers" war, nachdem er sich mit einer 5 Vol.-Proz. CO_2 enthaltenden Atmosphäre ins Gleichgewicht gesetzt hat, bei Beginn des Versuchs kleiner als diejenige des Blutes. Nun begünstigt einerseits die alkalische Reaktion des „Ringers", wie ebenfalls von *Warburg*[1]) und seinen Mitarbeitern nachgewiesen wurde, die glykolytischen Vorgänge, und zwar steigt die Glykolyse mit dem Wachsen des p_H bis 8 ziemlich steil an. Bei unseren Versuchen, bei denen es mehr auf die Vergleichswerte der Glykolyse durch Organe normaler und Carcinomtiere als auf die absoluten Werte ankam, war also die über der Blutalkaleszenz liegende Alkaleszenz unseres „Ringers" eher von Vorteil. Andererseits muß man bedenken, daß die bei der Glykolyse gebildete Säure das p_H des „Ringers" im Laufe des Versuchs nach der sauren Seite verschiebt. Man kann zwar diese Verschiebung dadurch beliebig klein machen, daß man zum Gewebsbrei sehr große Mengen „Ringer" zusetzt. Hätten wir aber unsere Versuche so angeordnet, daß wir sehr große Mengen „Ringer" von p_H 7,46 (dem durchschnittlichen p_H des Blutes entsprechend) zusetzten, so würde die Genauigkeit der Resultate darunter sehr leiden, da wir ja die Glykolyse aus der Differenz der Gesamtkohlehydratmenge am Anfang

[1]) *Warburg, Posener* und *Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 313, 1924.

und am Ende des Versuchs ermittelten. Die erste dieser Zahlen hätte sich durch Zugabe großer Mengen zuckerhaltigen „Ringers" erhöht, während die Glykolyse aber wahrscheinlich nicht in demselben Maße gestiegen wäre. Die prozentuellen Ausschläge bei der kolorimetrischen Bestimmung wären aber dadurch wesentlich kleiner geworden. Wir waren also gezwungen, möglichst wenig „Ringer" zum Gewebe zuzusetzen und mußten deswegen seine Anfangsalkalität steigern. Eine einfache Überschlagsrechnung zeigt, in welchem Ausmaß sich das p_H des „Ringers" während eines Glykolyseversuchs ändern mußte.

Am Anfang des Versuchs ist p_H 7,78 (berechnet aus den Konzentrationen des $NaHCO_3$ und der Kohlensäure im „Ringer"), nach der von *Hasselbalch*[1]) angegebenen Formel. In unseren Versuchen hat die Leber von Carcinomtieren durchschnittlich etwa 3 mg Glucose pro 1 g Feuchtgewichtsgewebe und 1 Stunde abgebaut. Da für die meisten Versuche etwa 0,3 g Gewebe suspendiert in 3 ccm „Ringer" verwendet wurde, so wurde bei einem zweistündigen Versuch von der Leber etwa 1,8 mg Traubenzucker abgebaut. Angenommen, daß dieser ganze Traubenzucker in Milchsäure übergeht, so hätte die entstandene Säure 1,68 mg $NaHCO_3$ in Lactat umgewandelt (bei Vernachlässigung der Hydrolyse des Lactats). In den zugesetzten 3 ccm unseres „Ringers" befanden sich 7,8 mg $NaHCO_3$. Durch die Überführung von 1,68 mg $NaHCO_3$ in Lactat würde das p_H, nach *Hasselbalch* berechnet, auf 7,67 sinken. Nun bilden sich bei dieser Überführung des $NaHCO_3$ in Lactat 0,88 mg CO_2; da unsere Schüttelgefäße ein Volumen von 20 ccm hatten, wovon 3 ccm durch den „Ringer" eingenommen waren, so befanden sich am Anfang des Versuchs in ihm 17 ccm eines Gasgemisches, das 5 Vol.-Proz. CO_2 enthielt. Die Menge CO_2 betrug also am Anfang des Versuchs 1,70 mg, sie stieg demnach während des Versuchs um etwa 50 Proz., wodurch wiederum das p_H nach *Hasselbalch* von 7,67 auf 7,49 absinken mußte. Das p_H unserer „Ringerlösung" hielt sich also während des Versuchs etwas über dem durchschnittlichen p_H des Blutes; nur wenn die Glykolyse den Durchschnittswert erheblich überstieg, konnte ein Absinken unter 7,46 erfolgen.

B. Versuchsergebnisse.

a) Erklärung zu den Tabellen.

Die Ergebnisse der nach dem eben beschriebenen Verfahren durchgeführten Versuche sind in den Tabellen I bis IX zusammengestellt. Die Versuche, bei denen verschiedene Organe bzw. Tumorgewebe von *demselben* Tiere auf ihr glykolytisches Vermögen untersucht wurden, tragen in den Tabellen *dieselben Protokollnummern*. In den Tabellen I und VI sind die Versuche über die Glykolyse von Lebern normal ernährter Carcinomtiere angeführt. Die meisten Versuche erstreckten sich über 2 Stunden, ein Teil über 1 Stunde.

In Tabelle I ist in der Kolonne 4 das *Gewicht* derjenigen *Leberportion* verzeichnet, die für den Glykolysenversuch verwendet worden ist. In Kolonne 6 ist die Menge der zu dieser Leberportion zugesetzten *„Ringerlösung"* in Kubikzentimetern, in Kolonne 7 deren *Glucosegehalt* in Milli-

[1]) *Hasselbalch*, diese Zeitschr. 78, 126, 1917.

grammen pro Kubikzentimeter verzeichnet. Die Kolonne 5 enthält den *Gesamtkohlehydratgehalt der betreffenden Leber* in Milligrammen pro 100 mg Gewebe, also Prozentgehalt. Dieser Wert wurde nach der bei der Beschreibung der Methodik angegebenen Weise in der Portion a bestimmt. Dabei wurde in den Fällen 13 bis 23 zur Portion a genau dieselbe Menge zuckerhaltigen „Ringers" zugesetzt, als es bei der in den Brutofen gelangenden Portion b der Fall war. Bei der Berechnung des Gesamtkohlehydratgehalts in der Portion a mußte natürlich diese zugesetzte Zuckermenge von der gefundenen Gesamtkohlehydratmenge subtrahiert werden. *Da die Probe a in der Regel annähernd dasselbe Gewicht hatte wie die Probe b, so bewirkte der Zusatz gleicher Mengen Traubenzucker zu beiden Portionen, daß in dem System (Probe a + „Ringer") sich fast genau dieselbe Kohlehydratmenge befand wie in dem System (Probe b + „Ringer") bei Beginn des Versuchs.* Wenn nun *nach Beendigung des Glykolysenversuchs* das System (Probe b + „Ringer") auf dasselbe Volumen gebracht wurde wie das System (Probe a + „Ringer"), und die beiden Lösungen kolorimetrisch in bezug auf ihren Kohlehydratgehalt verglichen wurden, so *zeigte jede Differenz zwischen der Farbstärke beider Lösungen in sicherer und augenscheinlicher Weise, daß eine Glykolyse stattgefunden hat.* In den Fällen 1 bis 12 wurde zur Probe a zuckerfreier „Ringer" zugesetzt.

Die Kolonne 8 enthält die *Faktoren* k_1 und k_2. Diese Zahlen haben folgende Bedeutung: Aus dem Gesamtkohlehydratgehalt der Leber, ausgedrückt in Milligrammen pro 100 mg Gewebe (s. Kolonne 5), wurde die Gesamtmenge der Kohlehydrate, die sich in der Leberportion b bei Beginn des Versuchs befand, durch Umrechnung auf dieses Gewicht (s. Kolonne 4) errechnet, zu dieser Zahl die Menge Traubenzucker addiert, die sich in der zur Probe b zugesetzten „Ringerlösung" befand (zu ersehen aus den Kolonnen 6 und 7), und diese Summe durch das Volumen eben dieser „Ringerlösung" dividiert. Die so berechnete Zahl ist der Faktor k_1. *Er bedeutet gewissermaßen die Konzentration der Gesamtkohlehydrate in dem System (Gewebsportion + „Ringer") in Milligrammen pro 1 ccm bei Beginn des Glykolysenversuchs.* Dabei wurde das Eigenvolumen des Gewebsbreies vernachlässigt. *Der Faktor* k_2 bedeutet dieselbe Größe *am Ende des Glykolysenversuchs.* Die Differenz k_1 bis k_2 mit dem Volumen der zur Portion b zugesetzten „Ringerlösung" multipliziert, ergibt also die gesamte Menge Kohlehydrate, die von der Portion b des Leberbreies im Laufe des Versuchs abgebaut wurde (s. Kolonne 9). $\frac{k_1 - k_2}{k_1} \times 100$ gibt offenbar dieselbe *während des Versuchs abgebaute Kohlehydratmenge in Prozenten der gesamten im System Leberportion b und „Ringer" am Anfang des Versuchs vorhandenen Kohlehydrate (s. Kolonne 10).* Die beiden Faktoren k_1 und k_2 geben ein ungefähres Bild von den Konzentrationsverhältnissen der Kohlehydrate in der zum Glykolysenversuch verwendeten Gewebssuspension. Diese Konzentrationsverhältnisse sind, wie wir später unten zeigen werden, von Einfluß auf die Gewebsglykolyse. Der Faktor $\frac{k_1 - k_2}{k_1} \times 100$ gibt ein Bild der kolorimetrisch gemessenen Ausschläge, auf Grund deren die Glykolyse berechnet worden ist, und läßt die Verläßlichkeit der für diese erhaltenen Werte erkennen. *Die Zahlen der Kolonne 11 geben die Glykolyse, umgerechnet auf 1 g Feuchtgewicht und 1 Stunde, an.* Zur Umrechnung auf das Trockengewicht müßte man diese Zahlen bei der Leber mit etwa 4, die später für die Nieren angegebenen mit etwa 5 multiplizieren.

b) Abbau der Gesamtkohlehydrate durch Carcinom- und Lebergewebe von normal ernährten Carcinomtieren und Lebergeweben von gesunden Tieren.

Tabelle I, Abbau der Gesamtkohlehydrate durch Lebergewebe von normal ernährten Carcinommäusen, denen die Carcinome vor mehr als 14 Tagen eingeimpft worden waren.

Überblicken wir jetzt die in der Tabelle I zusammengestellten Resultate! *Von den 23 zweistündigen Versuchen ergab sich in 21 eine beträchtliche Abnahme der Kohlehydrate* (s. Kolonne 10 und 11). In zwei Fällen, Protokollnummer 3 und 21, blieb die Abnahme aus. In Prozenten der gesamten, bei Beginn des Versuchs vorhandenen Kohlehydratmenge beträgt der Abbau *5,2 bis 36,7 Proz.* (s. Kolonne 10). Die Glykolyse pro 1 g Feuchtgewebe und 1 Stunde schwankt zwischen **1,03 bis 6,29 mg** (Kolonne 11). Von den neun einstündigen Versuchen zeigten vier Abnahmen, die in Prozenten der Gesamtkohlehydrate am Anfang des Versuchs *4,7 bis 17,4 Proz.* betrugen, die Glykolyse pro 1 g Gewebe und 1 Stunde schwankt zwischen **0,79 bis 4,01 mg.** In fünf Versuchen war keine deutliche Abnahme der Kohlehydrate festzustellen. (Von diesen fünf Fällen gehören die Fälle 29, 30 und 31 zu der oben unter A 1 erwähnten Tumorgeneration, die eine augenfällige Abnahme der Tumormalignität aufwies.)

Vergleichen wir jetzt mit diesen Resultaten diejenigen der Tabelle II und III!

Tabelle II, Abbau der Kohlehydrate durch Lebergewebe von normal ernährten gesunden Mäusen.

Tabelle III, Abbau der Kohlehydrate durch Mäusecarcinom.

In der Tabelle II haben die unter gleichen Überschriften wie in der Tabelle I verzeichneten Zahlen dieselbe Bedeutung wie in der Tabelle I. Dies gilt auch für alle anderen Tabellen dieser Versuchsreihe. Von den elf Lebern gesunder Mäuse der Tabelle II zeigten drei, Protokoll 1, 6 und 10, *nicht die geringste Abnahme* der Kohlehydrate während eines zweistündigen Aufenthalts im Brutofen. In zwei Fällen, Protokoll 3 und 5, waren die prozentuellen Abnahmen (Kolonne 8) *4,3 bzw. 5,5 Proz.*, und diesen geringen prozentuellen Ausschlägen entspricht ein Kohlehydratabbau pro 1 g Gewebe und 1 Stunde von **1,52 bis 1,58 mg.** In den übrigen sechs Versuchen schwanken die prozentuellen Abnahmen zwischen *0,7 und 3,7 Proz.*, der Kohlehydratabbau pro 1 g Gewebe und 1 Stunde zwischen **0,10 bis 0,72 mg.** In allen elf Fällen ging der kolorimetrisch festgestellte Ausschlag nicht über die Fehlergrenze der Methode, die $\pm$ 4 Proz. beträgt, hinaus, und der aus ihm berechnete Kohlehydratabbau pro 1 g und 1 Stunde, der ohnehin in neun von den elf Fällen weit kleiner ist als die entsprechenden Werte der Tabelle I,

hat keine Bedeutung. Die geringe prozentuelle Abnahme der Gesamtkohlehydrate bei Lebern normaler Tiere beruht, wie die Tabellen lehren, nicht etwa auf einem größeren Kohlehydratreichtum derselben (s. k_1 der betreffenden Tabelle), es zeigt sich vielmehr, daß bei hohem Anfangsgehalt der Leber an Kohlehydraten die Glykolyse eher stärker wird, und der Kohlehydratabbau, wie wir später bei den Versuchen über die Glykolyse der Lebern hungernder Carcinommäuse zeigen werden, geht mit dem Kohlehydratreichtum der Leber ziemlich parallel.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß, während in elf normalen Fällen in zweistündigen Versuchen der Abbau der Kohlehydrate so klein war, daß die festgestellten Ausschläge innerhalb der Fehlergrenze unserer Methode lagen, in 23 Fällen von Carcinommäusen in 19 Fällen ein weit über den Fehlergrenzen der Methode liegender Abbau der Kohlehydrate festgestellt werden konnte. Dabei betrachten wir alle Fälle der Tabelle I, in denen der Ausschlag unter 8 Proz. war, noch als negativ. Die einstündigen Versuche weisen selbstverständlich kleinere prozentuelle Ausschläge auf, und von neun Fällen haben sogar fünf keinen Ausschlag gezeigt. Von den fünf Fällen handelt es sich aber bei drei Fällen, wie oben schon erwähnt, um Lebern von Carcinommäusen, deren Tumoren eine stark herabgesetzte Malignität aufwiesen.

In der Tabelle III sind sechs Versuche über den *Kohlehydratabbau* durch *Mäusecarcinom* zusammengestellt. Sämtliche Versuche weisen eine beträchtliche Glykolyse auf, die prozentuellen Ausschläge schwanken von *20,8 bis 62,0 Proz.*, die absoluten Werte für die Glykolyse pro 1 g Feuchtgewebe und 1 Stunde von 2,14 bis 6,20 mg. Der Mittelwert der Glykolyse beträgt *4,17 mg*. Das Carcinomgewebe enthält, wie aus der Kolonne 3 der Tabelle III ersichtlich, ziemlich beträchtliche Mengen an Gesamtkohlehydraten. Dieser Wert schwankt von 0,42 bis 1,09 mg pro 0,1 g Gewebe. Es bleibt dabei aber die Frage offen, ein wie großer Anteil dieses mittels unserer Methodik bestimmten Wertes als Glucose bzw. Glykogen zu betrachten ist, und welcher Anteil als an Gewebseiweiß und Nucleoproteide gebundenes, mittels dieser Methode bis zu einem gewissen Grade mitbestimmbares „Strukturkohlehydrat" anzusprechen sei.

Wenn wir jetzt nun die *Glykolysenwerte* der Tabelle I mit denjenigen der Tabelle III vergleichen, so bemerken wir, *daß beide Werte von derselben Größenordnung sind. Es tritt also hier die bemerkenswerte Tatsache zutage, daß das nichtcarcinomatöse Lebergewebe eines Carcinomtieres und das Carcinomgewebe desselben fast im selben Maße die Fähigkeit besitzen, Kohlehydrate abzubauen.* Will man also die Erhöhung der glykolytischen Fähigkeit der Carcinomzellen, wie sie zuerst von *Warburg* in exakter Weise nachgewiesen worden ist, nachweisen, so muß man als Vergleichsobjekt ein normales Gewebe eines *gesunden* Tieres heran-

ziehen. Ein Vergleich der Tabellen II und III zeigt die Richtigkeit dieser Angaben. Führt man hingegen als Vergleich zur Erhöhung der Carcinomglykolyse das gesunde Organ des Carcinomtieres an, so läßt sich diese Erhöhung der Carcinomglykolyse kaum nachweisen.

c) Versuche über den Kohlehydratabbau durch Lebern hungernder Normal- und Carcinomtiere.

Es erschien uns wünschenswert, die Versuche über den Kohlehydratabbau durch die Leber in der Form zu wiederholen, daß wir die Tiere, denen dann die Leber für den Versuch entnommen werden sollte, vorher 18 bis 64 Stunden hungern ließen. Wir hofften dadurch zunächst einen Einblick zu gewinnen, ob die im Versuch abgebaute Menge der Kohlehydrate hauptsächlich aus dem der „Ringerlösung" *zugesetzten* Traubenzucker oder aus dem *Gewebsglykogen* der Leber stammte. Im letzten Falle müßten die absoluten Werte des Kohlehydratabbaues im Versuch mit Lebern von Hungercarcinomtieren kleiner erscheinen. Andererseits könnte eine Abnahme des Glykogens im Hunger bei gleichbleibender Glykolyse, ceteris paribus, eine größere *prozentische* Glykolyse bedingen, was aber, wie wir vorausschicken möchten, nicht der Fall war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen IV und V zusammengestellt.

Tabelle IV, Kohlehydratabbau durch Lebern von Carcinomtieren, die vor dem Versuch gehungert haben.

Tabelle V, Kohlehydratabbau durch Lebern von Normaltieren, die vor dem Versuch hungerten.

In der Tabelle IV finden wir Resultate aus 15 Versuchen an Lebern von Carcinommäusen, die vorher *gehungert* haben. Bei den Fällen 6 bis 15 wurde zu der zur Ausgangsbestimmung dienenden Leberportion a ebensoviel *zuckerhaltiger* „Ringer" zugesetzt wie zu der Portion b. Es sind elf zweistündige und vier einstündige Versuche. Der Kohlehydratgehalt der Leber schwankt zwischen 0,1 bis 1,0 mg pro 100 mg Gewebe Feuchtgewicht. Die prozentuellen Abnahmen bewegten sich bei den zweistündigen Versuchen zwischen *5,5 und 35,7 Proz.*, kein einziger Versuch war ganz negativ. Die entsprechenden absoluten Zahlen für den Kohlehydratabbau betragen **0,63 bis 3,88 mg** pro Gramm und Stunde. Bei dem einstündigen Versuch schwanken die Ausschläge zwischen *9,3 bis 28,6 Proz.*, die absoluten Zahlen zwischen **1,24 bis 4,09 mg.** Die prozentuellen Ausschläge halten sich also ungefähr in denselben Grenzen, wie es bei Versuchen mit *normal* ernährten Carcinomtieren der Fall war, die absoluten Werte des Kohlehydratabbaues dagegen sind kleiner. Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, daß die Größe des Kohlehydratabbaues *von dem Kohlehydratbestand der*

Leber abhängig ist. Tatsächlich geht der Kohlehydratabbau sowohl relativ wie absolut, wie aus dem Vergleich der Werte der Kolonnen 11 und 12 mit denjenigen der Kolonne 5 hervorgeht, dem Kohlehydratgehalt der Leber ziemlich parallel. Bereits bei einem Gehalt von 1 mg Kohlehydrate pro 100 mg Gewebe, Protokoll 4 und 5, erreichen die absoluten Werte für den Kohlehydratabbau Werte, wie wir sie bei den Versuchen mit Lebern normal ernährter Carcinomtiere bei großen prozentuellen Ausschlägen gesehen haben.

In der Tabelle V finden wir neun Versuche mit Lebern von *normalen Mäusen*, die 18 bis 68 Stunden gehungert haben. Der Kohlehydratgehalt der Lebern schwankt zwischen 0,37 bis 2,63 mg pro 100 mg Gewebe (letzterer Wert nach 18 Stunden Hunger). *In keinem einzigen Falle war relativ oder absolut ein nennenswerter Kohlehydratabbau festzustellen.* In drei Fällen hat das System (Leberportion b + „Ringer") einen etwas höheren Kohlehydratgehalt als das System (Portion a + „Ringer") gezeigt (1,6 bis 3,9 Proz.), was offenbar auf Fehler der Methode zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß während in 15 Fällen von Hungercarcinomtieren, sowohl nach einer wie nach 2 Stunden Aufenthalt im Brutofen, ein beträchtlicher Abbau der Kohlehydrate gefunden wurde, wobei die kolorimetrischen Ausschläge immer, zum Teil weit, über die Fehlergrenzen der Methode hinausgingen, war dies bei neun untersuchten Lebern von normalen Hungermäusen bei keiner einzigen der Fall. Die bei den Lebern von Hungercarcinommäusen stattgefundene Glykolyse geht mit dem Kohlehydratgehalt der betreffenden Lebern ziemlich parallel. Die Versuche an Tieren, die vorher gehungert haben, haben also dasselbe Resultat ergeben wie diejenigen bei normal ernährten Tieren.

d) Zeitpunkt des Auftretens des vermehrten Kohlehydratabbaues durch die Leber beim Carcinom.

Es lag jetzt die Frage nahe, in welchem Zusammenhang die bei der Leber beobachtete Erhöhung des Kohlehydratabbaues mit *der Entwicklung* des auf die Maus überimpften Tumors steht. Trat sie erst zu einem Zeitpunkt auf, wo der Tumor eine *exzessive Größe* erreicht hatte und seine unheilvolle Wirkung im Organismus des damit behafteten Tieres voll entwickelte, oder genügte schon der *Beginn des Wachstums*, um den erwähnten Effekt bei der Leber hervortreten zu lassen? Um diese Frage der Lösung näherzubringen, untersuchten wir bei einigen Carcinommäusen den Kohlehydratabbau durch die Leber in *frühen* Stadien der Carcinomentwicklung, und zwar in einem Falle 2 Tage, in zwei Fällen 3 Tage, in einem Falle 6 Tage, in drei Fällen 7 und in einem Falle 9 Tage seit der Überimpfung des Tumors.

Die Versuche sind in Tabelle VI zusammengestellt. Es zeigt sich, daß, vom *sechsten Tage nach der Überimpfung angefangen, eine Erhöhung des Kohlehydratabbaues durch die Leber festgestellt werden konnte*, Protokoll 4 bis 8. Im Falle 4 finden wir einen sehr großen Ausschlag, hier herrschten aber abnorme Verhältnisse, da der etwa erbsengroße Tumor durch seine Lage eine Obturation der Blase und des Darms bewirkt hat. Das Tier wurde im moribunden Zustand zum Versuch verwendet. *Die Tumore hatten in den Fällen 4 bis 8 etwa Erbsengröße, in den Fällen 1 bis 3 war Tumorgewebe in situ makroskopisch nicht zu bemerken.*

Tabelle VI, Kohlehydratabbau durch die Leber von Carcinommäusen bei frühem Entwicklungsstadium des Carcinoms.

e) Versuche über den Kohlehydratabbau durch Nieren normaler und Carcinomtiere.

Auf Grund der Ergebnisse der bisher mitgeteilten Versuche lag die Vermutung nahe, daß, so wie die Leber der Carcinomtiere, auch *andere Organe* eine Erhöhung des kohlehydratspaltenden Vermögens gegenüber der Norm aufweisen. Wir haben vorläufig nur die *Niere* von Carcinomtieren darauf untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen VII, VIII, IX zusammengestellt. Die untersuchten Nieren wurden in der Regel von denselben Tieren entnommen, von denen auch die Lebern auf ihr Vermögen, Kohlehydrate abzubauen, geprüft wurden. Die Nieren in den Tabellen VII, VIII und IX und die Lebern in den Tabellen I, II, IV und V tragen, wenn sie von demselben Tiere stammen, je dieselbe Protokollnummer. Die 15 Fälle der Tabelle VII betreffen Nieren *normal* ernährter Carcinommäuse, die sechs Fälle der Tabelle VIII sind Nieren von *Carcinommäusen*, die vorher 24 bis 63 Stunden *gehungert* haben. Von den acht Fällen der Tabelle IX betreffen die drei letzten Nieren von *normal ernährten gesunden Tieren*, die fünf ersten Nieren von normalen Tieren, die vorher 18 bis 48 Stunden gehungert haben. Die Versuche an Nieren gesunder Tiere dauerten alle 2 Stunden, von den 21 Nieren der Carcinomtiere waren zwölf 2 Stunden, neun 1 Stunde im Brutschrank.

Tabelle VII, Kohlehydratabbau durch die Niere von normal ernährten Carcinommäusen.

Tabelle VIII, Kohlehydratabbau durch die Niere von gehungerten Carcinommäusen.

Tabelle IX. Kohlehydratabbau durch die Niere von gesunden Mäusen.

Aus den Tabellen VII, VIII und IX ist zu ersehen, daß *sowohl die Nieren der normal ernährten oder vorher gehungerten Carcinommäuse, als auch diejenigen der gesunden Mäuse in hohem Grade die Fähigkeit*

besitzen, Kohlehydrate abzubauen. Bei Carcinomnieren beträgt der Abbau der Kohlehydrate in Prozenten ihrer Gesamtkohlehydratmenge im Gewebsbrei und dem ihn umspülenden „Ringer" *8 bis 54 Proz.*, nur in zwei unter 21 Fällen war kein Kohlehydratabbau festzustellen. Von den zwölf zweistündigen Versuchen der Tabellen VII und VIII hat nur ein Fall keinen Abbau der Kohlehydrate gezeigt, bei einem Falle betrug die prozentuelle Abnahme 13,5 Proz., in den anderen zehn Fällen betrug sie *weit über 20 Proz.* Von den neun einstündigen Versuchen war einer negativ, die restlichen positiv, wobei die prozentuellen Abnahmen zwischen *8 und 45,2 Proz.* schwanken. Die absoluten Werte pro 1 g Gewebefeuchtgewicht und 1 Stunde schwanken in den Tabellen VII und VIII zwischen **1,10 bis 4,36 mg** in den zweistündigen Versuchen, der Mittelwert beträgt **2,64 mg**, in den einstündigen Versuchen schwanken dieselben Größen zwischen **1,23 bis 4,27 mg**, der Mittelwert beträgt **2,30 mg**. Bei den Nieren normaler Mäuse in der Tabelle IX schwanken dieselben Zahlen zwischen **0,73 bis 3,73 mg**, der Mittelwert beträgt **2,28 mg**. Die Versuchsdauer bei den letzteren Versuchen betrug 2 Stunden. Die aus den zweistündigen Versuchen errechneten absoluten Werte sind insofern verläßlicher, als sie aus großen prozentuellen Ausschlägen gewonnen worden sind.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Niere von Carcinommäusen Kohlehydrate vielleicht in etwas höherem Maße abzubauen vermag als die Niere von normalen Mäusen. Dieser Unterschied ist aber viel kleiner, als es bei den Lebern der Fall war. *Jedoch baut auch schon die Niere normaler Mäuse in sehr starkem Maße Kohlehydrate ab.*

III. Versuche, in denen die Glykolyse durch Messung des Glucoseschwunds aus der „Ringerlösung" ermittelt wurde.

A. Methodik.

Die Bestimmung der Abnahme der Glucosekonzentration in einer Flüssigkeit, in der Gewebe suspendiert ist, begegnet, wie oben schon einmal erwähnt, der Schwierigkeit, daß aus dem Gewebe in die Flüssigkeit sowohl aus Eigenglykogen der Gewebe entstandene Glucose, als auch das Glykogen selbst und verschiedene reduzierende Substanzen übergehen. Dies bewirkt aber, daß in der das Gewebe umspülenden „Ringerlösung" der Gehalt an reduzierenden Substanzen zunächst nicht abnimmt, sondern zunimmt. Diese Zunahme der reduzierenden Substanzen ist am stärksten bei der Leber, aber auch bei anderen Organen, wie z. B. Milz und Niere, ist sie deutlich wahrzunehmen. Dies bewirkt aber, daß man auf diesem Wege *die Glykolyse in der ersten Versuchsstunde gar nicht messen kann*, da sie *durch die Neubildung von Glucose aus dem Gewebsglykogen vollständig verdeckt wird.* Erst nachdem durch die Tätigkeit der diastatischen Enzyme die Hauptmenge des Glykogens hydrolytisch gespalten worden ist und die Diffusion von reduzierenden Substanzen aus dem Gewebe in die „Ringerlösung" sich stark vermindert hat, nimmt der Schwund von Glucose infolge von Glykolyse überhand und kann wahrgenommen und gemessen werden.

Der Zeitpunkt, von dem an dies möglich ist, ist je nach dem Versuch und dem dazu verwendeten Organ ganz verschieden. Offenbar steht das mit dem Glykogenreichtum des betreffenden Organs mit der Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung, mit der Stärke des ihm entgegengesetzten Prozesses, der Glykolyse, im Zusammenhang. Es ist klar, daß dadurch die Versuchsdauer länger sein muß; denn der Zeitpunkt, wo die Glykolyse von der Leber der Carcinomtiere meßbar wird, wird z. B. hier in der Regel nicht vor 2 Stunden, bei der Niere nicht vor 1 Stunde erreicht. Beim Carcinomgewebe dagegen ist schon infolge geringer Glykogenmengen und starker Glykolyse bei zweistündiger Versuchsdauer auch mit diesem Verfahren eine beträchtliche Glykolyse festzustellen. Da die Menge der reduzierenden Substanzen von so vielen, wie oben erwähnten, Faktoren abhängt, können die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse nicht ganz eindeutig sein.

Stellten wir z. B. fest, daß die Leber eines Carcinomtieres in der dritten Versuchsstunde eine beträchtliche Glykolyse zeigte, während in derselben Zeit dies bei der Leber eines gesunden Tieres nicht der Fall war, so konnte man diesen Tatbestand auch so deuten, daß auch bei der Leber eines gesunden Tieres eine Glykolyse von ungefähr derselben Stärke stattgefunden hat, wie im Falle der Carcinomtiere, nur daß sie hier dadurch verdeckt worden ist, daß die Leber normaler Tiere im Gegensatz zur Leber der Carcinomtiere noch in der dritten, ja sogar vierten Versuchsstunde beträchtliche Mengen reduzierender Substanzen aus ihrem eigenen Glykogen abspaltet. So würde die vermeintliche *Verschiedenheit der glykolytischen Prozesse* von Organen normaler und Carcinomtiere in Wirklichkeit eine *Verschiedenheit der diastatischen* Prozesse derselben bedeuten. Andererseits könnten infolge der notwendigen Verlängerung der Versuchsdauer auch *Prozesse bakteriellen Ursprungs* im Spiele sein. Wir mußten also bei allen Manipulationen bei Ansetzen eines Versuchs auf *Wahrung* einer möglichsten *Sterilität* achten. Doch auch ohne dies kann diesem Einwand keine größere Bedeutung beigemessen werden, da es nicht einzusehen ist, warum die Glykolyse bakteriellen Ursprungs sich nur in den Fällen bemerkbar machen sollte, wo gesunde Organe der Carcinomtiere zur Verwendung kamen. Vollständig konnte in unseren früheren Versuchen beiden Schwierigkeiten nur dadurch ausgewichen werden, daß man statt des Schwundes der Glucose den Schwund der *Gesamtkohlehydrate* als Maß der Glykolyse herangezogen hat, wobei die Versuchsdauer nicht über 2 Stunden ausgedehnt werden brauchte. *Dabei wurde aber nur nachgewiesen, daß ein erhöhter Abbau von Gesamtkohlehydraten durch Lebern und Nieren von Carcinomtieren stattgefunden hat.* Ob aber dieser *Kohlehydratschwund zur Gänze oder zum Teil Abbau der Glucose bedeutet, sollte erst durch diese Versuche entschieden werden.* Dabei war es allerdings von vornherein klar, daß die Resultate dieser zweiten Methode nur dann verwertet werden konnten, wenn sie einigermaßen mit den Resultaten der ersteren Methode in Einklang standen.

Da bei diesem Verfahren, wie gesagt, die Versuchsdauer über 2 Stunden betragen mußte, haben wir unter Wahrung der *Sterilität* gearbeitet. Die Organe wurden nach allgemein chirurgischen Prinzipien unter aseptischen Kautelen entnommen, in mit entfetteter Watte geschlossene Gläschen gebracht, die vorher im überhitzten Dampf sterilisiert, nachher im Trockenschrank getrocknet und nach Erkalten derselben gewogen wurden. Für einen jeden Versuch wurde eine Leber bzw. die Nieren mehrerer Mäuse verwendet.

Die Lebern bzw. die Nieren wurden mit einer sterilen Schere, wie bei der Beschreibung des früheren Verfahrens geschildert, zerkleinert, mit *sterilem „Ringer"* bzw. für manche Versuche mit *sterilem Pferdeserum* versetzt und dann in die Schüttelgefäße übergeführt. Als *Schüttelgefäße* benutzten wir bei diesen Versuchen Rundkölbchen von etwa 100 ccm Inhalt, die mit Gummistöpseln verschlossen waren. Durch den Stöpsel wurde eine dicke Punktionsnadel gesteckt, dieselbe hatte am oberen Ende einen Hahn; das obere Ende der Punktionsnadel wurde mit Watte verschlossen. Wir sterilisierten das Gefäß bei offenem Hahn im überhitzten Dampf, der Hahn wurde sofort nach Herausnahme dse Gefäßes aus dem Sterilisator geschlossen. Die Überführung der Gewebssuspension aus dem zur Wägung gebrauchten Gefäß in den Schüttelkolben erfolgte mit Hilfe einer besonderen *Aufziehvorrichtung*, die vorher ebenfalls durch Auskochen sterilisiert worden war. Diese Aufziehvorrichtung bestand aus einem etwa 10 mm dicken, an beiden Enden etwas verjüngten Glasrohr, das am oberen Ende mit Hilfe eines Gummischlauchs mit einer 20-ccm-Rekordspritze verbunden war. Durch Aufziehen des heruntergedrückten Kolbens der Rekordspritze wurde die Glasröhre mit der aufzusaugenden Flüssigkeit gefüllt. Die Aufziehvorrichtung wurde zuvor mit demselben „Ringer", den wir zum Versuch verwendeten, durch Ansaugen desselben gewaschen, sodann das im „Ringer" suspendierte Gewebe aus dem zur Wägung benutzten Glasgefäß aufgezogen und in den Schüttelkolben entleert.

Sodann folgte die *Schüttelung* der Gefäße im Brutofen in der oben angegebenen Weise. Die zum Versuch verwendete „Ringerlösung" enthielt pro *100 ccm 0,2 g Dextrose* (nur in einigen Fällen aber keinen Traubenzucker), sonst entsprach sie in ihrer Zusammensetzung der vorher angegebenen. Nun wurde nach 1 Stunde Schüttelung das Gefäß aus dem Brutschrank herausgenommen, die Gewebssuspension absitzen gelassen, aus dem Schüttelgefäß nachher mit einer sterilen Pipette, die oben mit entfetteter Watte verschlossen war, je 2 ccm der Flüssigkeit unter aseptischen Kautelen entnommen und in eine graduierte Eprouvette gebracht. Dann wurde der Schüttelkolben wieder in den Brutofen gestellt, dasselbe Verfahren nach der zweiten, dritten, manchmal auch der vierten Versuchsstunde wiederholt.

Die aus dem Schüttelgefäß entnommene Flüssigkeit war leicht getrübt, enthielt aber keine ins Gewicht fallenden Gewebsmengen. In ihr wurde der *Traubenzucker durch Messung des Reduktionsvermögens gegenüber Pikrinsäure nach der Vorschrift, die Stanley Benedikt*[1]) für die Bestimmung des Blutzuckers angegeben hat, bestimmt. Zu 2 ccm der entnommenen Flüssigkeit werden 4 ccm destilliertes Wasser hinzugefügt, mit der nach *Benedikt* hergestellten Pikrinsäurelösung auf 25 ccm aufgefüllt. Nach kurzem Stehen wird die Probe filtriert, 8 ccm des Filtrats mit 1 ccm 20proz. Na_2CO_3-Lösung versetzt, für 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gebracht, nach der Abkühlung mit einer Standardlösung verglichen.

An den Proben, die wir nach 1 oder 2 Stunden Aufenthalt der Gewebssuspension im Brutofen aus den Gefäßen entnahmen, stellten wir die *Zunahme* der Konzentration der Glucose im „Ringer", entstanden durch Verzuckerung des Gewebsglykogens, fest. In den folgenden Proben wurde das *Absinken* der Glucosekonzentration im „Ringer" infolge Überhandnahme der Glykolyse gemessen.

---

[1]) *St. Benedict*, Journ. of biol. Chem. **20**, 61.

B. Versuchsergebnisse.

a) Erklärung zu den Tabellen.

Die Ergebnisse der mit dieser Methodik ausgeführten Versuche sind in den Tabellen X bis XIV zusammengestellt.

Tabelle X, Glykolyse durch Lebern von Carcinomtieren.

Tabelle XI, Glykolyse durch Carcinom und Sarkom von Maus und Ratte.

Die Tabellen X und XI sind so angeordnet, daß die *Zahlen*, die in beiden Tabellen zur *gleichen Protokollnummer* gehören, sich auf *Tumor- oder Lebergewebe desselben Tieres beziehen.* Die Bedeutung der in den einzelnen Kolonnen angegebenen Zahlen ist aus den Überschriften derselben ohne weiteres zu ersehen, nur die Kolonne 8 der Tabelle X erfordert einige Erläuterungen. Die Zahlen der Subkolonne a geben die Glykolyse pro Gramm Gewebe und Stunde in Milligrammen an, die in der *zweiten Stunde* des Versuchs gegenüber der Konzentration der Glucose am Ende der *ersten Stunde* folgendermaßen berechnet wurde: Durch Multiplikation der am Ende der zweiten Stunde gefundenen Glucosekonzentration mit der in diesem Zeitpunkt im Schüttelgefäß befindlichen „Ringermenge" wurde die Gesamtmenge der reduzierenden Substanzen im „Ringer" ermittelt. Aus der vorher am Ende der ersten Stunde gefundenen Glucosekonzentration im „Ringer" wurde die Gesamtmenge der Glucose in derselben „Ringermenge" am Ende der ersten Stunde berechnet. Durch Subtraktion dieser beiden Zahlen erhält man den Überschuß des in der zweiten Stunde abgebauten Traubenzuckers über den im Laufe der zweiten Stunde vom Organ *neu* abgegebenen. Diese Zahl, dividiert durch das Gewicht des zum Versuch verwendeten Gewebes, ergibt die Zahl der Subkolonne a. Die Zahlen der übrigen Subkolonnen der Kolonne 8 wurden in derselben Weise errechnet, nur wurde als Ausgangspunkt für die Ermittlung des Glykolysenwertes pro 1 g Gewebe und 1 Stunde nicht die in einer, sondern in *mehreren Stunden* vom Gewebe abgebaute Glucose verwendet und dieselbe durch die Zeit dividiert, in der man die Glykolyse vor sich gehen ließ. So wurde für die Subkolonnen b und c die Glucosekonzentration am Ende der dritten und vierten Versuchsstunde mit derjenigen am Ende der ersten Versuchsstunde verglichen, auf diese Art der Abbau durch 2 oder 3 Stunden errechnet, diese Zahl durch das Gewicht des Gewebes und die Anzahl der Versuchsstunden dividiert. Wurde der Versuch also durch mehrere Stunden fortgesetzt, so bedeutet diese Zahl den Mittelwert für die während der Versuchsdauer stattgefundene Glykolyse.

Nehmen wir als Beispiel den Fall aus der Tabelle X, Protokoll 1. Hier war die Glucosekonzentration im „Ringer" am Ende der ersten Versuchsstunde 2,77 mg, am Ende der dritten Versuchsstunde 2,52 mg pro 1 ccm „Ringer"; das Volumen der „Ringerlösung" betrug am Anfang des Versuchs 30 ccm. Da wir nach einer Stunde zur Vornahme der Ausgangsbestimmung 2 ccm der Flüssigkeit entnahmen, war das Volumen während der zweiten und dritten Stunde 28 ccm. Die gesamte Glucosemenge im „Ringer" war also am Ende der dritten Stunde $28 \times 2{,}51$, das sind 70,2 mg. In diesen 28 ccm befanden sich aber am Ende der ersten Stunde $28 \times 2{,}77$ mg, das sind 77,5 mg, so sind also in 2 Stunden von 1,04 g Gewebe $77{,}5 - 70{,}2 = 7{,}3$ mg, oder pro 1 g Gewebe und 1 Stunde $\frac{7{,}3}{1{,}04 \cdot 2} = 3{,}51$ mg Glucose abgebaut worden.

In den in der Tabelle X zusammengestellten Versuchen waren elf aus Lebern von Carcinom- und Sarkommäusen, eine aus einer mit Sarkom behafteten Ratte. In drei Fällen (Protokoll 6, 9, 11) konnte keine deutliche Abnahme der reduzierenden Substanzen in den ersten 4 Stunden des Versuchs festgestellt werden, im Falle 6 stieg die Konzentration der reduzierenden Substanzen im „Ringer" noch in der vierten Stunde an; wahrscheinlich war die Diffusion der aus der Verzuckerung des Glykogens entstandenen Glucose aus dem Gewebe noch in der vierten Stunde so stark, daß dadurch der Schwund der Glucose infolge Glykolyse vollständig verdeckt war. Im Falle 9 stieg die Konzentration der reduzierenden Substanzen in der zweiten und dritten Stunde etwas an, um in der vierten Stunde ein wenig abzusinken. Im Falle 11 war das Absinken der Glucosekonzentration ebenfalls ganz geringfügig. In den beiden letztgenannten Fällen blieben die Konzentrationsschwankungen der Glucose im „Ringer" innerhalb der Fehlergrenzen unserer Methodik. Auch in diesen Fällen könnte es sich um ein, wenn auch nur partielles, Verschleiern des Zuckerschwunds durch die oben erwähnte Nachdiffusion aus dem Gewebe handeln. In den Fällen 8, 9, 11 und 12 enthielt der „Ringer" bei Beginn des Versuchs keinen Traubenzucker. Wir hofften dadurch einerseits, daß die Diffusion des Zuckers aus dem Gewebe rascher beendigt sein würde, und daß die Verschleierung des Zuckerschwunds sich dadurch in allen Fällen wird vermeiden lassen. Andererseits hofften wir die Konzentration der reduzierenden Substanzen im „Ringer" derart zu erniedrigen, daß die prozentuellen Ausschläge der Glykolyse dadurch größer würden.

Wir sehen in der Tabelle X in zwei Dritteln der Fälle *deutliche* Ausschläge, die zwischen *12 und 33 Proz.* des Anfangswerts der Glucosekonzentration schwanken. Es ist von Wichtigkeit, daß der Schwund der reduzierenden Substanzen in den späteren Versuchsstunden keineswegs stärker erscheint als in den ersten Versuchsstunden. Das zeigt, daß die in den ersten Stunden festgestellte Glykolyse nicht *bakteriellen Ursprungs* sein kann, denn die bakterielle Glykolyse müßte mit der Dauer des Versuchs der Vermehrung der Bakterien entsprechen, in den späteren Versuchsstunden immer stärker zum Vorschein kommen. Die absoluten Werte der *Glykolyse durch Lebern von Tumormäusen* schwanken, wenn wir die Fälle, bei denen die Ausschläge innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen, ausschließen, zwischen **1,2 bis 6,7 mg**, *im Mittel* **2,34 mg** *pro 1 g Gewebe und 1 Stunde.* Nehmen wir das Trockengewicht der Leber zu 25 Proz. ihres Feuchtgewichts an, so würde die Glykolyse pro 1 g Trockengewicht und 1 Stunde im Mittel **9,36 mg** betragen. Die starken Schwankungen des so gemessenen glykolytischen Vermögens der Leber rühren sicherlich zum Teil daher, daß wir ja nicht die volle Glykolyse, sondern nur die *Differenz* zwischen

der durch die Glykolyse zum Verschwinden gebrachten und der aus dem Gewebe in den „Ringern" neu dazugekommenen Glucose messen konnten.

In der Tabelle XI finden sich die Ergebnisse der Versuche über die Glykolyse des *Mäusecarcinoms* und *-sarkoms* zusammengestellt. Die Glykolyse pro 1 g Gewebe und 1 Stunde schwankt zwischen **3,06 bis 9,2 mg**, *der Mittelwert beträgt* **5,59 mg.** Die mit Hilfe der Gesamtkohlehydratbestimmungen gefundenen Werte für die Glykolyse des Carcinomgewebes (s. Tabelle III) sind keineswegs höher, eher kleiner, als die in der Tabelle XI angegebenen. Man muß aber bedenken, daß in den Versuchen der Tabelle XI die Anfangskonzentration der Glucose im „Ringer" viel höher war als in den Versuchen der Tabelle III, und daß ferner das Verhältnis des Volumens des „Ringers" zu dem darin suspendierten Gewebe in den Versuchen der Tabelle XI wie 1 : 13 bis 50 war, während in den Versuchen der Tabelle III dieselben Größen sich wie etwa 1 : 10 verhielten. Die während eines Versuchs durch den Tumor gebildete Milchsäure bewirkt eine Säuerung des „Ringers", die um so stärker sein wird, je kleiner das Verhältnis Volumen des „Ringers " : Menge des darin suspendierten Gewebes ist. Dies bedeutet aber, daß die Reaktion des „Ringers" in den Versuchen der Tabelle III weniger alkalisch war als in denjenigen der Tabelle XI. Dieser Unterschied in der Glucosekonzentration und Reaktion des „Ringers" in beiden Versuchsreihen könnte für die Unterschiede in der Größe der Glykolyse verantwortlich sein.

Vergleicht man nun die *Glykolysenwerte* für das *Tumorgewebe* mit denjenigen für das *Lebergewebe* der Carcinomtiere, so sieht man, daß sie ungefähr von *derselben Größenordnung* sind. Übrigens muß man bedenken, daß die Maskierung der Glykolyse durch die Abgabe des im Organ enthaltenen Glykogens an die umgebende Flüssigkeit im Falle der Leber größer gewesen sein dürfte als im Falle des Carcinoms, ist doch der Gesamtkohlehydratgehalt des Carcinoms als Glucose berechnet nur 0,3 bis 0,6 Proz. (Leber dagegen durchschnittlich 2 bis 4 Proz.), wovon noch ein großer Teil an Eiweiß und Nucleoproteide gebundene kohlehydratartige Substanzen sind, die beim Aufenthalt des Gewebes im Brutschrank nicht an den „Ringer" abgegeben werden dürften. Aus dieser Überlegung heraus kann man annehmen, daß die bei der Leber von Carcinomtieren mit dieser Methode gemessene Glykolyse im Vergleich zu der des Carcinomgewebes eher zu klein sein dürfte.

Tabelle XII, Glykolyse durch Lebern von gesunden Tieren.

Die Berechnung der einzelnen Zahlen der Tabelle XII erfolgte nach demselben Prinzip wie in den Tabellen X und XI. *Im Gegensatz zum Verhalten der Leber von Tumortieren* zeigt sich, wie aus der

Tabelle XII ersichtlich, in Versuchen von *Lebergeweben normaler Tiere selbst nach vierstündigem Aufenthalt im Brutofen in keinem einzigen Falle eine Abnahme der Glucosekonzentration im „Ringer"*. Die absolute Konzentration der Glucose im „Ringer" hält sich in beiden Versuchsreihen ungefähr in denselben Grenzen. Würde in den normalen Fällen eine Glykolyse von annähernd derselben Größe wie in der Tabelle X stattgefunden haben, so wären die Ausschläge kolorimetrisch ebensogut zu erkennen gewesen (es sei denn, man nimmt an, daß die Verzuckerung des Glykogens in den Lebern normaler Tiere protrahierter verläuft, als es bei Lebern von Tumortieren der Fall ist. Dann könnte allerdings in normalen Fällen noch in der dritten und vierten Stunde so viel Glucose aus dem Gewebsglykogen in den „Ringer" übergehen, daß dadurch die Glykolyse in diesen Fällen vollständig verdeckt wird. Dieser Einwand könnte indessen nur durch Bestimmungen der Gesamtkohlehydrate, wie sie in der ersten Versuchsreihe ausgeführt worden sind, *vollständig widerlegt* werden).

b) Versuche über die Glykolyse durch Nieren von normalen und Carcinomtieren.

Die Niere gibt so wenig reduzierende Substanzen an den „Ringer" ab, daß die Glykolyse hier zum Teil schon in der ersten Versuchsstunde manifest wird.

Tabelle XIII, Glykolyse durch Nieren von Carcinomtieren.

Tabelle XIV, Glykolyse durch Nieren von gesunden Tieren.

Für Nieren der Tumortiere schwankt die Glykolyse pro 1 g Gewebe und 1 Stunde in der zweiten und dritten Versuchsstunde von **1,20 bis 2,63 mg**, *der Mittelwert beträgt* **1,98 mg**. *Bei Nieren von normalen Mäusen* schwankt sie zwischen **0,88 bis 2,89 mg**, *der Mittelwert beträgt* **1,31 mg**. Der Mittelwert der Nierenglykolyse von Carcinomtieren ist aus 12 Einzelwerten von sechs Versuchen, derjenige für normale Mäuse aus 15 Einzelwerten von acht Versuchen gewonnen. Dabei ist aber im Auge zu behalten, daß *zu einem jeden Versuch Nieren aus fünf bis sechs Mäusen verwendet wurden, so daß die angegebenen Werte in Wirklichkeit Mittelwerte für die Glykolyse der Nieren von 70 bis 80 verschiedenen Individuen sind.* Die Maskierung der Glykolyse durch das an den „Ringer" abgegebene Glykogen dürfte im Falle der Niere kaum in Frage kommen.

IV. Diskussion der Resultate.

Überblicken wir die gesamten Resultate, so können wir zunächst feststellen, daß die nicht carcinomatöse *Leber von Carcinomtieren eine*

beträchtliche Erhöhung des glykolytischen Vermögens gegenüber der Norm aufweist. Sie vermag sowohl den von außen zugeführten Traubenzucker abzubauen, was aus den Resultaten der zweiten Versuchsreihe (Abschnitt III) zu ersehen ist, wie auch wahrscheinlich ihr eigenes Glykogen anzugreifen, was man aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe erschließen kann (Abschnitt II).

Der mittlere Wert der Glykolyse der Leber von Carcinomtieren beträgt in der Tabelle X 2,34 mg pro Gramm Feuchtgewebe und Stunde; in den 23 zweistündigen Versuchen der Tabelle I 2,66 mg. Doch sind diese Werte nur angenähert miteinander vergleichbar. Denn die Zahlen der Tabelle X betreffen den Zuckerabbau durch die Leber in der *zweiten, dritten* und in manchen Fällen auch der *vierten Stunde seit Beginn des Glykolysenversuchs.* Die Zahlen der Tabelle I dagegen betreffen den Kohlehydratabbau in den *zwei ersten Versuchsstunden.*

Nun ist aber während der zweiten Stunde die Glucosekonzentration in der „Ringerlösung" höher als in der ersten, bedingt dadurch, daß aus der Leber nach Verzuckerung des Glykogens Glucose in den „Ringer" übergeht. Die Verteilung des in dem System (Leberbrei + „Ringerlösung") vor sich gehenden Kohlehydratabbaues, auf die Dextrose im „Ringer" einerseits und das Glykogen in der Leber andererseits, dürfte also in der zweiten und weiteren Versuchsstunden anders sein als in der ersten. Immerhin können wir auf Grund des Vergleichs der beiden oben erwähnten Versuchsreihen sagen, daß ein *beträchtlicher Teil des* in der ersten und zweiten Versuchsstunde beobachteten *Gesamtkohlehydratabbaues* (s. Abschnitt II) *als Glykolyse, d. h. Abbau von Traubenzucker als solcher, zu betrachten ist.*

Was den Kohlehydratabbau *durch die Niere* betrifft, so zeigt sich auch hier bei den Carcinomtieren eine, wenn auch geringe Erhöhung des Mittelwerts gegenüber der Norm. In der Versuchsreihe Abschnitt II macht diese *Erhöhung 16 Proz.*, in Abschnitt III sogar *51 Proz.* aus. Es zeigt sich aber in unseren Versuchen, daß schon *die Niere von normalen Tieren ein weit höheres glykolytisches Vermögen besitzt als die entsprechende Leber.*

Dieser Befund steht nun im Widerspruch mit den Ergebnissen anderer Autoren. So hat z. B. *Minami*[1]) mit der *Warburg*schen Versuchsanordnung die Milchsäurebildung aus Traubenzucker bei der Niere kleiner gefunden als bei der Leber. *Lasnitzki*[2]) hat allerdings für die Niere 8 mg pro Gramm Trockengewicht und Stunde und für die Leber nur 3 mg als Glykolysenwert angegeben. Aber auch seine Zahl für die Glykolyse der Niere ist noch immer kleiner als unser Mittelwert

[1]) *S. Minami*, diese Zeitschr. **142**, 334, 1923.
[2]) *Lasnitzki*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **22**, H. 6, 531, 1925.

(errechnet aus den Versuchen des Abschnitts II). Dieser beträgt 2,28 mg pro Gramm Gewebefeuchtgewicht, also etwa 11,4 mg pro Gramm Gewebetrockengewicht. Man muß aber bedenken, daß *Lasnitzki* mit seiner Methode für das Carcinomgewebe eine etwa zehnmal so große Glykolyse findet als für das Nierengewebe, während bei uns sich dieses Verhältnis unter zwei hält. Wenn wir nicht annehmen wollen, daß speziell das glykolytische Vermögen des Carcinoms durch unser Verfahren stärker geschädigt worden ist als dasjenige der Niere, was ja wenig wahrscheinlich ist, so können wir die Diskrepanz dieser Befunde nur so erklären: Die oben erwähnten Autoren *haben nicht den Abbau der Kohlehydrate, vielmehr die Bildung der Milchsäure gemessen. Diese zwei Prozesse decken sich zwar beim Carcinomgewebe, könnten aber bei der Niere möglicherweise verschieden sein.* Doch können wir darüber vorläufig nichts aussagen.

Welche Möglichkeiten bieten sich uns nun zur Erklärung der hier mitgeteilten Befunde? Erinnern wir uns an die Versuche von *Neuschloss*[1]), aus denen hervorgeht, daß die Organe der Tiere, die mit Carcinom behaftet sind, bis auf die Milz (die eine Ausnahmestellung diesbezüglich einnimmt), eine gegenüber der Norm *verminderte Atmung* aufweisen. Wir können also sagen, daß der Stoffwechsel, zumindest der Leber und der Niere, bei Vorhandensein eines Carcinoms im Organismus derart verändert zu werden scheint, daß er dem Typus des Carcinomstoffwechsels ähnlicher wird. Denn nach *Warburg* und seinen Mitarbeitern ist es ja für die Carcinomzelle *charakteristisch, daß bei ungefähr gleichbleibender Atmung die anoxybiotische Glykolyse gegenüber normalem Gewebe erhöht ist, das Verhältnis* $\frac{\text{anaerobe Glykolyse}}{\text{Atmung}}$ *dementsprechend sehr hoch ist. In derselben Richtung ändert sich aber, wie aus unseren Versuchen zu ersehen ist, dieses Verhältnis bei der Leber und Niere von Tieren, auf die Carcinom überimpft worden ist, gegenüber der Norm.* Ob allerdings die Kohlehydrate durch die Organe des Carcinomtieres zu Milchsäure abgebaut werden, ist noch unbekannt. Versuche zur Klärung dieser Frage sind im Gange.

Das Vorhandensein einer solchen „Umstellung" des Organstoffwechsels beim Carcinomtier, gleichgültig, ob sie schon in vivo zum Vorschein kommt oder erst in vitro eine hierzu bestehende „Bereitschaft" beim Absterben der Zelle manifestiert, und ob sie etwas für die Carcinomkrankheit Spezifisches darstellt, ist gar nicht überraschend. Es muß vielmehr auf Grund der bekannten Tatsache, daß man durch Überimpfung zellfreier Extrakte aus Hühnersarkom bei Hühnern wieder Sarkom erzeugen kann [was nach *Rh. Erdmann*[2]) auch im Falle des Rattensarkoms gelingt], sowie der

[1]) *S. M. Neuschloss*, Klin. Wochenschr. Nr. 2, S. 57, 1924.
[2]) *Rh. Erdmann*, Deutsch. med. Woch. 1926, H. 9.

neuesten Arbeiten von *Carrel*[1]), sowie derjenigen von *Warburg, Posener* und *Negelein*[2]), sowie der älteren Arbeiten von *N. Watermann*[3]), welch letztere aber zu unserer Kenntnis gekommen ist, während diese vorliegende Arbeit schon im Gange war, diese „Umstellung" des Stoffwechsels beim Carcinom recht plausibel erscheinen. *Carrel* hat gezeigt, daß mononucleare *Leucocyten*, die in Gewebskultur lebten, auf Zusatz von *Rous*schem Sarkomfiltrat zu malignen Geschwulstzellen wurden. Nun sind nach den Untersuchungen *Warburgs* und seiner Mitarbeiter nur wachsende Zellen zur starken Glykolyse befähigt. Bei einem malignen Wachstum bleibt dabei die Zellatmung weit hinter der Glykolyse zurück. Wenn nun also zellfreie Filtrate aus Tumoren normale tierische Zellen zum Wachstum bringen können, so sind zwei Möglichkeiten vorhanden: Die eine Möglichkeit wäre die, daß die Tumorfiltrate *solche Zellen zum malignen Wachstum anregen*, die vorher eine *geringe anaerobe Glykolyse* aufwiesen. Die zweite Möglichkeit ist die, daß die *zum Wachstum angeregten Zellen* schon *vorher ein hohes glykolytisches Vermögen* besaßen, wie es z. B. bei embryonalen oder Nervenzellen der Fall ist. Im ersteren Falle würde die Wirkung der Tumorfiltrate auf die Zellen so zu verstehen sein, daß in ihnen ein Agens enthalten ist, welches die *Glykolyse* normaler Körperzellen *erhöhen kann*. Im zweiten Falle würde es sich bei der Wirkung der Tumorfiltrate um die *Herabsetzung der Atmung von an und für sich stark glykolysierenden Zellen handeln*. *Warburg, Posener* und *Negelein*[4]) glauben, daß nur das letztere der Fall ist. Sie halten eine primäre Erhöhung des schon vorhandenen, verhältnismäßig schwachen glykolytischen Vermögens für nicht wahrscheinlich. Sie nehmen vielmehr in einem Gewebe zweierlei Zellarten an: Zellen, die durch Sauerstoffmangel absterben und Zellen, die trotz des Sauerstoffmangels infolge ihrer glykolytischen Fähigkeit sich weiter entwickeln können. Durch das Absterben der ersten Zellart, die einen überwiegenden Teil des Gewebsgewichts ausmacht, täuscht die übriggebliebene, unverändert weiter glykolysierende Zellart prozentuell eine höhere Glykolyse vor. Nun konnte *N. Watermann*[5]) in der oben zitierten Arbeit den Befund mitteilen, daß schon *kleine* Änderungen in dem Medium, in dem die Zelle lebt, genügen, um eine Erhöhung ihres glykolytischen Vermögens zu bewirken. So bedingt das Sinken der Calciumkonzentration im „Ringer" ein Ansteigen des glykolytischen Vermögens der Carcinomzellen. Auch hat *Watermann* gezeigt, daß Zusatz von wässerigem Tumorextrakt zur *Niere* die Milchsäurebildung durch letztere steigert. Der Tumorextrakt selbst zeigt dabei keine Glykolyse. Doch stehen auch diese Befunde zu einer Herabsetzung der *Atmung* im Sinne *Warburgs* sicherlich nicht im Widerspruch, da über die Größe dieses Faktors nichts ausgesagt wird.

---

[1]) *Carrel*, C. r. des séances de la soc. de biol. **93**, 1083, 1925.

[2]) *Warburg, Posener* und *Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 315, 1924.

[3]) *N. Watermann*, Arch. néerlandais de phys. de l'homme et d'animaux **9**, 573.

[4]) *Warburg, Posener* und *Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 329, 1924 (Hypothese der Entstehung von Tumoren).

[5]) *N. Watermann*, Nederlandsch Tyjdschr. v. Geneesk. **69**, 577, 1925; Arch. néerlandais de phys. de l'homme et d'animaux **9**, 573.

Wenn auch *Watermann* nicht bewiesen hat, daß dieser Einfluß *nur* Tumorextrakten und nicht auch Extrakten aus anderem Gewebe zukommt, so bekräftigen doch seine Befunde im Verein mit den obigen Überlegungen die Meinung, daß *in Tumoren Stoffe enthalten sein könnten, die die anaerobe Glykolyse der normalen tierischen Zellen direkt oder indirekt zu steigern imstande sind.* Nun ist aber sehr wahrscheinlich, daß diese Stoffe in die Blutbahn des an Carcinom erkrankten Tieres gelangen und auch an vom Sitz des Tumors *entfernter* Stelle ihre Wirkung entfalten.

C. F. Cori und *G. T. Cori*[1]) haben den Nachweis geführt, daß das Blut in der Flügelvene eines mit *Rous*schem Sarkom behafteten Huhnes auf der Tumorseite weniger Glucose und mehr Milchsäure enthält als auf der gesunden Seite. Schon *Tadenuma, Hotta* und *Homma*[2]) haben die Meinung ausgesprochen, daß die Wirkung des Tumors, wie oben erwähnt, auch an entfernter Stelle nachzuweisen sei. Sie behaupten gefunden zu haben, daß das Blut von Hühnern mit Spindelzellensarkom eine höhere Glykolyse aufweist, als dasjenige normaler Tiere. Weiter behaupten sie, daß das aus der Flügelvene der Seite, wo das Sarkom sitzt, entnommene Blut eine höhere Glykolyse zeigt, als dasjenige aus der Vene der gesunden Seite. Die von den oben zitierten Autoren mitgeteilten Befunde können wir jedoch *weder zur Unterstützung unserer ähnlichen Befunde heranziehen, noch ihre Arbeit als Vorläufer der unserigen betrachten.* Für die erste Behauptung bringen sie nämlich in ihrer Mitteilung keine zahlenmäßigen Belege; für die andere führen sie acht Versuche an. Von diesen acht Versuchen weisen vier ein Resultat auf, das der Behauptung der Autoren entspricht, vier dagegen haben ein entgegengesetztes Resultat. Die Ausschläge sind in beiden Fällen ungefähr gleich. Es muß aber noch betont werden, daß die Methode, deren sich die Autoren zur Bestimmung der Glykolyse im Blute bedienten, nicht einwandfrei ist. Denn sie ermitteln die Glykolyse einfach aus der Differenz in der Menge der reduzierenden Substanzen im Blute vor und nach mehrstündigem Aufenthalt im Brutofen. Hierbei bleibt die Tatsache unberücksichtigt, daß von den Kohlehydraten in den Blutkörperchen und aus den Eiweißkörpern, des Plasmas durch Umwandlung, reduzierende Substanzen an die Plasmaflüssigkeit abgegeben werden können, wodurch eine eventuelle Glykolyse vollständig verschleiert werden könnte. Versuche, die diesem Gesichtspunkt Rechnung tragen, sind im Gange.

Was endlich die Bedeutung der hier mitgeteilten Befunde für das Verständnis der Pathologie der Krebskrankheit betrifft, so muß jede Meinungsäußerung darüber als verfrüht angesehen werden, solange nicht die bei uns im Gange befindlichen Versuche eindeutig zeigen, ob der Zuckerabbau durch die Leber bzw. andere Organe schon *in vivo* stattfindet und ob eine Beziehung dieser vermehrten Organglykolyse zum *Grade der Malignität* des Tumors besteht.

---

[1]) *C. F. Cori* und *G. T. Cori*, Journ. of biol. Chem. **65**, 397, 1925.

[2]) *Tadenuma, Hotta* und *Homma*, Deutsch. med. Wochenschr. 1924, S. 1051; diese Zeitschr. **187**, 543, 1923.

Tabelle 1. Leber von Ratten [illegible]

1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12
Nr.	Zeitdauer nach der Impfung Tage	Impfmodalitäten, Mäusegeneration Carcinom	Gewicht des zum Versuch verwendeten Leberbreies (Portion b) g	Ges.-Kohlehydratgehalt der Leber zu Beginn des Versuchs mg pro 0,1 g Gewebe	Menge der Ringerlösg., die zum Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucosegehalt in der zum Gewebe zugesetzten Ringerlösg. mg pro ccm	Faktor k_1	Faktor k_2	Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer mg	Kohlehydratschw., bezogen auf Anfangskohlehydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg	Anmerkungen
1	15	1. Generation	0,280	1,58	3	0,92	2,39	1,65	2,22	*30,7*	**3,96**	Leber groß, Farbe hellgelb
2	15		0,310	0,77	3	0,92	1,72	1,34	1,12	*21,6*	**1,80**	
3	15		0,262	3,00	3	0,92	3,54	3,54	*θ*	*θ*	*θ*	
4	17		0,303	1,70	3	1,84	3,56	2,32	3,72	*36,4*	**6,29**	
5	17		0,531	2,92	5	1,84	4,94	4,31	3,13	*12,6*	**2,91**	Leber sehr groß, hellgelb
6	17		0,341	2,56	3	1,84	4,75	3,67	3,23	*22,6*	**4,73**	
7	18		0,305	2,14	3	1,84	4,02	3,51	1,52	*12,6*	**2,52**	
8	18		0,208	1,44	2	1,84	3,34	2,89	0,89	*13,3*	**2,14**	
9	18		0,373	2,21	3	1,84	4,59	3,99	2,00	*13,1*	**2,68**	
10	18		0,429	2,43	5	1,84	3,92	3,55	1,85	*9,4*	**2,15**	
11	14	2. Generation	0,398	8,64	4	0,92	9,52	8,82	2,78	*7,6*	**3,50**	
12	15		0,287	5,93	5	0,92	4,32	3,79	2,68	*12,7*	**4,67**	
13	23		0,465	0,63	5	0,92	1,51	1,21	1,50	*20,6*	**1,61**	Maus sehr hinfällig, sehr großer Tumor
14	17	3. Generation	0,257	2,36	2	1,00	4,03	3,67	0,72	*8,9*	**1,40**	
15	18		0,218	0,88	3	1,00	1,64	1,49	0,45	*9,1*	**1,03**	
16	21		0,359	2,43	4	1,00	3,18	2,18	4,01	*31,4*	**5,56**	
17	25		0,291	2,10	3	1,00	3,04	2,48	1,68	*18,5*	**2,88**	
18	21	4. Generation	0,272	1,82	3	1,00	2,65	2,35	0,91	*11,4*	**1,67**	Sehr großer Tumor
19	17		0,308	2,80	3	1,00	3,87	3,10	1,72	*20,0*	**2,79**	
20	22		0,436	1,22	4	1,00	2,34	1,74	2,37	*25,4*	**2,72**	
21	22		0,247	1,57	3	1,00	2,29	2,29	*θ*	*θ*	*θ*	
22	18		0,246	1,02	3	1,00	1,84	1,64	0,58	*10,9*	**1,18**	
23	22		0,246	3,93	3	1,00	4,22	3,99	0,70	*5,2*	**1,43**	
24	29		0,248	1,86	3	1,00	2,53	2,09	1,35	*17,4*	**2,72**	
25	17	5. Generation	0,208	2,36	2	1,00	3,44	3,15	0,58	*8,1*	**2,70**	
26	18		0,249	0,88	3	1,00	1,73	1,52	0,63	*12,8*	**2,53**	
27	21		0,320	1,82	4	1,00	2,46	2,21	0,96	*11,0*	**3,00**	
28	24		0,208	3,30	2	1,00	4,43	4,43	*θ*	*θ*	*θ*	
29	21	6. Generation	0,366	3,31	3	1,00	5,04	5,04	*θ*	*θ*	*θ*	
30	22		0,402	0,59	4	1,00	1,59	1,58	0,05	*θ*	*θ*	
31	26		0,435	0,86	4	1,00	1,93	1,85	0,35	*4,7*	**0,79**	
32	23	5. Generation	0,313	1,67	3	1,00	2,74	2,32	1,26	*15,2*	**4,01**	

Versuchsdauer 2 Stunden

Versuchsdauer 1 Stunde

Tabelle II. Leber von normal ernährten *gesunden* Mäusen.

1	2	3	4	5	6		7	8	9
Nr.	Gewicht d. zum Versuch verwendeten Leberbreies (Portion b) g	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucosegehalt in der zum Gewebe zugesetzten Ringerlösung mg pro ccm	Gesamtkohlehydratgehalt der Leber mg pro 0,1 g Gewebe	Faktor k_1	Faktor k_2	Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer mg	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg
1	0,240	2	0,92	1,60	2,84	2,84	0	0	0
2	0,204	2	0,92	2,22	3,18	3,12	0,13	1,9	0,32
3	0,180	2	0,92	4,72	5,17	4,88	0,57	5,5	1,58
4	0,207	2	0,92	3,31	4,35	4,20	0,30	3,4	0,72
5	0,168	2	0,92	5,91	5,88	5,63	0,51	4,3	1,52
6	0,213	2	0,92	1,91	2,95	2,95	0	0	0
7	0,291	3	0,92	3,47	4,29	4,21	0,22	2,1	0,38
8	0,363	4	0,92	2,37	3,07	3,04	0,11	0,9	0,15
9	0,296	3	0,92	2,21	3,10	3,08	0,06	0,7	0,10
10	0,460	5	0,92	2,99	3,67	3,67	0	0	0
11	0,238	3	1,00	2,29	2,82	2,71	0,32	3,7	0,67
							Mittel:	2,0	0,50

Tabelle III. Kohlehydratabbau durch *Mäusecarcinom.*

1	2	3	4	5	6	7		8	9	10
Nr.	Gewicht des zum Versuch verwendeten Carcinomgewebes g	Gesamtkohlehydratgehalt des Carcinoms zu Beg. d. Versuchs mg pro 0,1 g Gewebe	Menge d. Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucosekonzentration in der zugesetzten Ringerlösung mg pro ccm	Dauer des Versuchs Stunden	Faktor k_1	Faktor k_2	Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer mg	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg
1	0,537	0,47	5	1,00	2	1,48	1,02	2,30	31,8	2,14
2	0,289	0,60	3	1,00	2	1,58	0,60	2,92	62,0	5,06
3	0,290	0,75	3	1,00	1	1,72	1,12	1,80	34,9	6,20
4	0,215	0,42	3	1,00	1	1,30	1,02	0,84	20,8	3,90
5	0,203	1,09	2	1,00	2	2,14	1,19	1,83	44,8	4,50
6	0,236	0,53	3	1,00	$1^1/_2$	1,42	1,03	1,17	27,5	3,20
									Mittel:	4,17

Tabelle IV.

Versuche über den Kohlehydratabbau durch Lebern von Carcinomtieren, die vor dem Versuch gehungert haben.

1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12	13
Nr.	Zeitdauer seit d. Impf. Tage	Impf.-modalitäten, Mäuse-generation Carcinom	Tiere haben v. d. Versuch gehungert Stdn.	Ges.-Kohle-hydratgehalt der Leber zu Beginn des Versuchs mg pro 0,1 g Gewebe	Menge der Ringerlösg., die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucose-konzentrat. in der zum Gewebe zu-gesetzten Ringerlösg. mg pro ccm	Gewicht des zum Versuch verwen-deten Leber-breies (Portion b) g	Faktor k_1	Faktor k_2	Ges. Kohle-hydrat-schwund während der ganzen Ver-suchsdauer mg	Kohle-hydratschw., bezogen auf Anfangs-kohle-hydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg	Anmerkungen
1	17	3. Gene-ration	42	0,79	3	1,00	0,333	1,88	1,42	1,38	*25,6*	2,07	Die Versuchsdauer betrug 2 Stunden
2	17		48	0,72	3	1,00	0,255	1,61	1,25	1,09	*23,7*	2,14	Leber groß, Farbe hell-gelb
3	17		48	0,62	3	1,00	0,295	1,61	1,42	0,56	*13,4*	0,95	
4	18		64	1,02	3	1,00	0,246	1,83	1,20	1,91	*35,2*	3,88	Tumor sehr groß
5	18		64	0,99	3	1,00	0,290	1,96	1,29	2,01	*35,7*	3,46	Leber groß, Farbe hell-gelb
6	19	4. Gene-ration	24	0,46	3	1,00	0,239	1,36	1,24	0,35	*9,1*	0,73	Tier sehr hinfällig
7	19		30	0,10	4	1,00	0,308	1,08	1,02	0,22	*5,5*	0,36	
8	19		37	0,38	3	1,00	0,275	1,35	1,21	0,42	*10,4*	0,76	Der Tumor besteht aus zwei kleinen zerfalle-nen Knoten
9	20		42	0,29	4	1,00	0,378	1,27	1,15	0,48	*9,5*	0,63	
10	20		48	0,75	3	1,00	0,318	1,80	1,50	0,87	*16,6*	1,34	Leber groß, Farbe hell-gelb
11	21		63	0,58	3	1,00	0,288	1,56	1,40	0,47	*11,0*	0,82	Tumor frisch exulceriert. Leber sehr groß, Farbe hellgelb
12	19	4. Gene-ration	24	0,46	3	1,00	0,303	1,46	1,31	0,47	*10,3*	1,55	Versuchs-dauer 1 Stunde
13	19		30	0,10	4	1,00	0,338	1,08	0,98	0,42	*9,3*	1,24	
14	19		31	0,16	4	1,00	0,387	1,15	1,00	0,60	*12,7*	1,55	
15	19		37	0,38	3	1,00	0,290	1,37	0,96	1,21	*28,6*	4,09	

Tabelle V. Kohlehydratabbau durch Lebergewebe von *gesunden* Tieren, die vor dem Versuch gehungert haben. Die Glucosekonzentration im „Ringer" betrug in allen diesen Versuchen 1 mg pro 1 ccm.

1	2	3	4	5	6		7	8	9
Nr.	Tiere haben vor dem Versuch gehungert Stunden	Gewicht des zum Versuch verwendeten Leberbreies (Portion b) g	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Gesamtkohlehydratgehalt der Leber zu Beginn des Versuchs mg pro 0,1 g Gewebe	Faktor k_1	Faktor k_2	Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer mg	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg
1	30	0,314	3	0,92	1,96	1,95	0,03	*0,25*	**0,05**
2	48	0,270	3	0,42	1,38	1,38	*θ*	*θ*	*θ*
3	18	0,249	3	2,63	3,18	3,18	*θ*	*θ*	*θ*
4	40	0,260	3	1,35	2,17	2,17	*θ*	*θ*	*θ*
5	24	0,325	3	0,89	1,96	1,95	0,04	*0,36*	**0,06**
6	68	0,309	3	0,37	1,38	1,38	*θ*	*θ*	*θ*
7	68	0,321	3	0,50	1,53	1,53	*θ*	5	*θ*
8	36	0,289	3	1,04	2,00	2,00	*θ*	*θ*	*θ*
9	40	0,333	3	0,83	1,92	1,92	*θ*	*θ*	*θ*
							Mittel:	*θ*	*θ*

Tabelle VI. Zeitpunkt des Auftretens des vermehrten Kohlehydratabbaues durch die Leber beim Carcinom.

1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12
Nr.	Zeitdauer seit der Impfung Tage	Impfmodalitäten, Generation Carcinom	Gewicht des zum Versuch verwendeten Leberbreies (Portion b) g	Ges.-Kohlehydratgehalt der Leber zu Beg. d. Vers. mg pro 0,1 g Gewebe	Menge der Ringerlsg., die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucosekonz. in der zum Gewebe zugesetzten Ringerlösg. mg pro ccm	Faktor k_1	Faktor k_2	Gesamter Kohlehydratschwund während d. ganz. Versuchsdauer mg	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate Proz.	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde mg	Anmerkungen
1	2	5. Generation	0,564	7,57	5	1,00	9,54	9,54	*θ*	*θ*	*θ*	Tumor in situ makroskopisch nicht nachweisbar
2	3		0,303	5,30	3	1,00	6,35	6,35	*θ*	*θ*	*θ*	
3	3		0,307	5,24	3	1,00	6,36	6,36	*θ*	*θ*	*θ*	
4	6		0,531	0,37	5	0,92	1,31	0,40	4,54	*69,0*	**4,27**	Tumor klein, erbsengroß
5	7		0,413	6,60	4	1,00	7,81	7,20	2,45	*7,0*	**2,96**	
6	7		0,261	1,05	3	1,00	1,91	1,64	0,82	*14,1*	**1,57**	
7	7		0,266	1,05	3	ohne Glucose	0,93	0,77	0,48	*17,2*	**0,90**	
8	9		0,287	0,40	3	1,00	1,38	0,99	1,16	*28,3*	**2,05**	Tumor bohnengr.

Tabelle VII.

Kohlehydratabbau durch Nierengewebe von *normal ernährten Carcinommäusen.*
Die Glucosekonzentration in dem Gewebe zugesetzten „Ringer" war in allen Fällen 1 mg pro 1 ccm.

1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	
Nr.	Zeitdauer seit der Impfung	Impfmodalitäten, Generation	Gewicht des zum Versuch verwendeten Nierenbreies	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde	Gesamt-Kohlehydratgehalt der Niere	Faktor		Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde	
					mg pro 0,1 g Gewebe	k_1	k_2				
	Tage	Carcinom	g	ccm				mg	Proz.	mg	
Tab. I											
15	18	3. Generation	0,083	1	0,68	1,56	1,36	0,21	*13,5*	1,26	Die Versuchsdauer betrug zwei Stunden
18	21	4. Generation	0,101	1	0,63	1,63	0,75	0,88	*54,0*	4,86	
16	21	3. Generation	0,128	2	0,43	1,28	0,74	1,08	*43,0*	4,28	
23	22	4. Generation	0,140	2	0,53	1,37	0,97	0,80	*29,2*	2,88	
Tab. VI											
5	7	5. Generation	0,158	2	0,64	1,51	0,93	1,16	*38,5*	3,67	
	9		0,166	2	0,14	1,12	0,65	0,93	*42,0*	2,80	
	9		0,126	2	0,66	1,42	0,96	0,92	*32,4*	3,65	
	7		0,153	2	0,63	1,48	0,89	1,18	*39,0*	3,85	
Tab. I											
28	24	5. Generation	0,106	1	0,67	1,70	1,57	0,13	*8,0*	1,23	Die Versuchsdauer betrug eine Stunde
	5		0,136	2	0,35	1,24	1,13	0,21	*8,3*	1,54	
	16	3. Generation	0,157	2	0,10	1,08	0,90	0,37	*18,0*	2,37	
	17		0,153	2	0,47	1,36	1,36	0	0	0	
	21		0,190	2	0,28	1,27	1,05	0,43	*17,3*	2,25	
31	26	6. Generation	0,103	1	0,34	1,35	0,91	0,44	*32,6*	4,27	
29	21		0,142	2	0,10	1,07	0,81	0,53	*25,0*	3,70	

Tabelle VIII. Kohlehydratabbau durch Nieren von *gehungerten* Carcinommäusen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12
Nr.	Zeitdauer seit der Impfung	Tiere haben vor dem Versuch gehungert	Menge der Ringerlösg., die dem Gewebe zugesetzt wurde	Ges.-Kohlehydratgehalt der Niere zu Beginn d. Versuchs	Versuchsdauer	Konzentrat. der Glucose im „Ringer" zu Beginn d. Versuchs	Gewicht des zum Versuch verwendeten Nierengewebes (Portion b)	Faktor		Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer	Kohlehydratschw., bezogen auf Anfangskohlehydrate	Glykolyse pro g Gewebefeucht-gewicht und Stunde
								k_1	k_2			
	Tage	Stunden	ccm	mg pro 0,1 g Gewebe	Stunden	mg pro ccm	g			mg	Proz.	mg
Tab. IV.												
6	19	24	2	0,03	2	1,00	0,141	1,02	0,69	0,66	*32,4*	**2,35**
8	19	37	1	0,34	2	1,00	0,121	1,41	1,14	0,27	*19,1*	**1,10** *)
9	20	42	1	0,35	2	1,00	0,125	1,44	1,44	θ	θ	θ
11	21	63	2	θ	2	1,00	0,151	1,00	0,79	0,42	*21,0*	**1,39** *)
7	19	30	2	0,01	1	1,00	0,142	1,01	0,82	0,38	*19,0*	**2,68**
14	19	31	1	0,37	1	1,00	0,123	1,46	0,80	0,66	*45,2*	**2,68**

*) Niere groß, Farbe hellgelb.

Tabelle IX. Kohlehydratabbau durch Nierengewebe von normalen Mäusen.
Die Versuchsdauer betrug 2 Stunden. Die Glucosekonzentration im „Ringer" war in allen Fällen 1 mg pro 1 ccm.

1	2	3	4	5	6		7	8	9
Nr.	Tiere haben vor dem Versuch gehungert	Gewicht des zum Versuch verwendeten Nierenbreies	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde	Gesamt-Kohlehydratgehalt der Niere	Faktor		Ges. Kohlehydratschwund während der ganzen Versuchsdauer	Kohlehydratschwund, bezogen auf Anfangskohlehydrate	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde
					k_1	k_2			
	Stunden	g	ccm	mg			mg	Proz.	mg
Tab. V									
5	24	0,149	2	0,13	1,09	0,88	0,42	*18,0*	**1,39**
4	40	0,154	2	0,09	1,07	0,80	0,53	*25,0*	**1,72**
	24	0,128	2	0,57	1,37	1,01	0,71	*25,8*	**2,78**
3	18	0,091	1	0,31	1,28	1,14	0,14	*11,0*	**0,73**
2	48	0,085	1	0,79	1,67	1,17	0,50	*30,0*	**2,97**
	normal ernährt	0,108	1	0,23	1,25	0,74	0,51	*40,8*	**2,36**
	„ „	0,170	2	0,12	1,10	0,67	0,86	*39,0*	**2,53**
Tab. VI									
11	„ „	0,092	1	0,64	1,59	0,90	0,69	*43,4*	**3,73**

Mittel: **2,28 mg**

Tabelle X.

Glykolyse durch Lebergewebe von *Carcinom- oder Sarkomtieren.*

1	2	3	4	5	6	7				8			9
Nr.	*Art* des Tieres, aus dem die Leber entnommen worden ist	Zeitdauer seit der Impfung	Gewicht des zum Versuch verwendeten Leberbreies	Menge der Ringerlösung, die d. Gewebe zugesetzt wurde	Glucosekonzentration in dieser Ringerlösg. am *Anfang* d. Versuchs	Glucosekonzentration in der Ringerlösung in mg pro ccm nach der Versuchsdauer von				*Glykolyse* pro g Gewebe und Stunde, errechnet aus den Konzentrationsänderung. d. Glucose im „Ringer" vom Ende der ersten Versuchsstunde bis Ende der			Anmerkungen
						a 1 Std.	b 2 Std.	c 3 Std.	d 4 Std.	a 2. Std.	b 3. Std.	c 4. Std.	
		Tage	g	ccm	mg pro ccm					mg	mg	mg	
1	Carcinommaus	15	1,04	30	2,00	2,77	—	2,52	—	—	**3,51**	—	Versuch, weitere 2 Stdn. fortgesetzt, ergab keine Glykolyse
2	Sarkommaus	16	1,14	22*)	1,23	1,43	—	1,24	—	—	**1,75**	—	
3	Carcinommaus	14	0,62	23	2,00	2,20	—	1,87	—	—	**4,78**	—	
4	Sarkommaus	16	0,87	20*)	0,65	1,50	—	1,08	—	—	**4,36**	—	
5	Sarkommaus	8	1,64	30	1,80	1,94	—	1,83	1,75	—	**1,00**	**1,30**	
6	Sarkommaus	12	2,16	20	1,80	3,25	—	3,53	3,65	—	*θ*	*θ*	Sehr protrahierte Verzuckerung des Gewebsglykogens. Lebern aus 2 Mäusen
7	Carcinommaus	18	1,00	20	1,80	2,43	2,06	—	1,69	**6,70**	—	**5,90**	Die Glucosekonzentration betrug nach 5 Stdn. 1,35 mg, die *Glykolyse 4,7 mg*
8	Sarkommaus	14	1,70	16	ohne Glucose	1,50	1,00	0,71	—	**4,20**	**2,00**	—	Versuch mit möglichster Sterilität! Parallelversuch zu Tabelle XII, Prot. 6
9	Carcinommaus	13	1,10	20	„ „	0,69	0,70	0,70	0,62	*θ*	*θ*	**1,00**	
10	Carcinommaus	18	1,41	16	0,98	1,52	—	1,29	—	—	**1,20**	—	Lebern aus 2 Mäusen
11	Carcinommaus	—	0,85	10	ohne Glucose	1,80	—	1,76	1,70	*θ*	**0,18**	**0,47**	
12	Sarkomratte**)	21	7,21	44	„ „	1,00	0,90	0,78	0,59	**0,55**	**0,70**	**1,04**	Die Glucosekonzentration betrug nach 5 Stdn. 0,38 mg, die *Glykolyse 1,08 mg*

*) Zum Leberbrei wurde statt Ringerlösung steriles Pferdeserum mit Glucosezusatz hinzugefügt.
**) Parallelversuch zu Tabelle XII, Prot. 9. Versuch möglichst steril angesetzt.

Tabelle XI. Glykolyse durch *Carcinom-* und *Sarkomgewebe.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nr.	Art des zum Versuch verwendeten Tumors	Dauer des Versuchs Stdn.	Gewicht des zum Versuch verwendeten Gewebes g	Art der Flüssigkeit, die dem Gewebe zugesetzt wurde	Menge dieser Flüssigkeit ccm	Glucosekonz. dieser Flüssigkeit zu Beginn des Versuchs mg pro ccm	Glucosekonz. dieser Flüssigkeit am Ende des Versuchs mg pro ccm	Glykolyse pro g Gewebe und Stunde, errechnet aus d. Konzentrationsänderungen der Glucose in d. Flüssigkeit während des Versuchs mg	Anmerkungen
1	Carcinom (einer Maus)	2	0,62	Steriles Pferdeserum mit Glucosezusatz	30	2,12	1,74	**9,20**	
2	Sarkom (einer Maus)	2	1,44	„Ringer"	30	1,50	0,99	**5,03**	
4	„ (einer Maus)	2	3,07	Steriles Pferdeserum mit Glucosezusatz	50	2,26	1,57	**5,60**	Versuch, weitere 2 Stdn. fortgesetzt, ergab keine weitere Glykolyse
6	„ (einer Maus)	2	1,47	„Ringer"	20	1,80	1,35	**3,06**	Versuch, weitere 2 Stdn. fortges., ergab eine Glykolyse v. 1,7 mg pro g u. Std.
	„ (einer Maus)	2	1,09	Steriles Pferdeserum mit Glucosezusatz	24	1,12	0,74	**5,20**	
	„ (einer Maus)	2	2,37	„Ringer"	40	2,25	1,55	**5,90**	
	Carcinom (einer Maus)	3	1,64	„Ringer"	30	2,00	1,05	**5,06**	Versuch, weitere 3 Stdn. fortges., ergab eine Glykolyse v. 5,06 mg pro g u. Std.
							Mittel:	**5,59**	

Tabelle XII. Glykolyse durch Lebergewebe von *normalen* Mäusen und Ratten.

1	2	3	4	5				6			7
Nr.	Gewicht des zum Versuch verwendeten Leberbreies g	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde ccm	Glucosekonzentration in der zum Gewebe zugesetzten Ringerlösung mg pro ccm	Glucosekonzentration in der Ringerlösung in mg pro ccm nach der Versuchsdauer von				*Glykolyse* pro g Gewebe und Stunde, errechnet aus den Konzentrationsänderung. d. Glucose im „Ringer" vom Ende der ersten Versuchsstunde bis Ende der			Anmerkungen
				a 1 Std.	b 2 Std.	c 3 Std.	d 4 Std.	a 2. Std. mg	b 3. Std. mg	c 4. Std. mg	
1	0,85	20	1,80	2,52	—	2,66	—	—	θ	—	
2	0,85	20	1,80	2,50	2,47	—	2,47	**0,54**	—	θ	
3	1,87	20	1,80	3,10	—	3,65	3,77	—	θ	θ	Lebern aus zwei Mäusen zum Versuch verwendet
4	0,72	15	Ohne Glucose	0,88	—	0,97	0,99	—	θ	θ	
5	0,91	30	2,00	2,71	—	2,83	—	—	θ	—	Die Glucosekonzentration betrug *nach 6 Stdn. Versuchsdauer* ebenfalls *2,83 mg, Glykolyse* 0
6	1,00	15	Ohne Glucose	1,20	—	1,25	—	—	θ	—	Dieser Versuch wurde absichtl. unsteril angesetzt, trotzdem keine Glykolyse. Vgl. Tab. XI, Prot. 8
7*)	1,42	14	0,98	1,81	—	1,87	—	—	θ	—	Lebern aus zwei Mäusen verwendet
8*)	1,32	13	Ohne Glucose	0,73	—	0,80	—	—	θ	—	„ „ „ „ „
9†)	6,37	40	„ 1,80"	1,24	2,10	2,60	3,32	θ	θ	θ	Die Glucosekonzentration betrug *nach 6 Stunden* Versuchsdauer ebenfalls *3,32 mg, Glykolyse* 0
10†)	4,89	50	„ 1,80"	2,40	3,40	4,08	—	θ	θ	θ	

1	2	3	4	5	6	7			8			9
Nr.	Art des Tieres, aus dem die Nieren verwendet worden sind	Zeitdauer seit der Impfung	Gewicht des zum Versuch verwendeten Nierenbreies	Menge der Ringerlösung, die dem Gewebe zugesetzt wurde	Glucosekonzentration in d. zugesetzten Ringerlösg. am Anfang d. Versuchs	Glucosekonzentration in der Ringerlösung in mg pro ccm nach der Versuchsdauer von			Glykolyse pro g Gewebe und Stunde, berechnet aus den Konzentrationsänderung. d. Glucose im „Ringer" vom Beginn des Versuchs bis Ende der			Anmerkungen
						a 1 Std.	b 2 Std.	c 3 Std.	a 1. Std.	b 2. Std.	c 3. Std.	
		Tage	g	ccm	mg pro ccm				mg	mg	mg	
1	5 Carcinommäuse	15	1,50	15	1,50	1,50	1,37	1,15	θ	1,57	2,48	
2	5	18	0,97	10	2,00	2,00	1,78	1,36	θ	1,75	2,80	
3	5	18	0,92	10	2,00	1,80	1,58	1,25	2,17	1,84	2,17	
4	5	19	0,83	10	2,00	1,80	1,64	1,47	2,40	1,73	1,20	
5	5	19	0,95	10	2,00	1,98	1,70	1,29	0,21	2,31	2,63	
6	6	20	1,40	10	2,00	1,78	1,32	1,00	1,57	2,45	1,86	
7	Sarkomratte	21	1,45	16	1,80	2,06	1,68	1,68	θ	3,60	θ	Glykolyse nach 4 Stdn. 4,1 mg, nach 5 Stdn. 4,2 mg
									Mittel: 1,98			

Tabelle XIV. Glykolyse durch Nierengewebe von *normalen* Tieren.

1	2	3	4	5			6			7
Nr.	Gewicht des zum Versuch verwendeten Nierengewebes	Menge der Ringerlösg., die dem Gewebe zugesetzt wurde	Glucosekonzentrat. in der zugesetzten Ringerlösg. zu Beginn d. Versuchs	Glucosekonzentration in der Ringerlösung in mg pro ccm nach der Versuchsdauer von			Glykolyse pro g Gewebe u. Stunde, berechnet aus d. Konzentrationsänderungen der Glucose im „Ringer" vom Beginn des Versuchs bis Ende der			Anmerkungen
				a 1 Std.	b 2 Std.	c 3 Std.	a 1. Std.	b 2. Std.	c 3. Std.	
	g	ccm	mg pro ccm				mg	mg	mg	
1	1,13	12	1,36	1,36	1,22	1,18	θ	1,20	0,31	Nieren von 6 Mäusen
2	0,97	10	2,00	2,00	1,86	1,67	θ	1,15	1,15	" " 6 "
3	1,07	10	2,00	2,00	1,70	1,53	θ	2,50	0,93	" " 6 "
4	0,93	10	2,00	2,00	2,00	—	θ	θ	—	" " 4 "
5	0,99	10	2,00	1,72	1,49	1,28	2,89	1,82	1,32	" " 4 "
6	0,98	10	2,00	1,86	1,62	1,46	1,42	1,93	1,02	" " 5 "
7	1,14	10	2,00	1,90	1,71	1,47	0,88	1,33	1,16	" " 4 "
8	1,23	10	2,00	2,00	1,60	1,41	θ	2,60	1,30	" " 5 "
9	1,37	14	1,80	1,90	1,82	1,62	θ	0,86	2,01	Niere einer Ratte *)
10	1,20	12	2,00	2,00	2,00	2,00	θ	θ	θ	" " "
							Mittel: 1,31			

*) Vgl. Tabelle VIII, Prot. 7. Dieselbe wurde möglichst steril, letztere ohne Beachtung der Sterilität behandelt. Glykolyse nach 4 Stdn. 2,71 mg, nach 5 Stdn. 1,95 mg.

Zusammenfassung.

1. In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob die an sich nicht carcinomatöse Leber und Niere von *an Carcinom erkrankten* Tieren eine höhere Glykolyse aufweisen als dieselben Organe von *normalen* Tieren.

2. Es wurde gezeigt, daß bei Mäusen schon vom sechsten Tage nach der Überimpfung von Carcinom die nicht carcinomatösen Lebern eine *sehr beträchtliche Steigerung ihrer glykolytischen Fähigkeit* aufweisen.

3. Es wurde gezeigt, daß die Leber von Carcinomtieren sowohl den ihnen von außen zugeführten Traubenzucker als auch wahrscheinlich ihr eigenes Glykogen stark abzubauen vermögen, wobei der Grad ihrer Glykolyse zum Teil von ihrem Gehalt an Kohlehydraten abhängig ist.

4. Bei der Niere war eine geringfügige Steigerung der Glykolyse angedeutet, aber nicht mit voller Sicherheit nachzuweisen.

5. Die Niere von gesunden Tieren zeigt ein weit größeres glykolytisches Vermögen als die Leber derselben.

6. Es wird die Meinung ausgesprochen, daß die bei den Organen von Carcinomtieren beobachtete Erhöhung der Glykolyse gegenüber der Norm durch den Übergang von glykolysesteigernden Substanzen aus dem Carcinom in die Blutbahn hervorgerufen sein könnte.

Weitere Untersuchungen zur Klärung der weiter oben angedeuteten Fragen sind im hiesigen Institut im Gange.

Zur Bestimmung des Fettsäuregehalts von Organen.

Von

Anton Fischer.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener physiologischen Universitätsinstitut.)

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Die modernen Methoden der Fettbestimmung beruhen alle auf dem Prinzip der Verseifung und Isolierung der hohen Fettsäuren.

Nachdem dieser Vorgang zuerst von *Liebermann* und *Székely*[1]) eingeschlagen worden ist, hatten später *Kumagawa* und *Suto*[2]) ihre Methode auf dieses Prinzip aufgebaut, und es ist seither letzterer Vorgang, vielfach modifiziert, nahezu ausschließlich zur Fettbestimmung verwendet worden.

Wenn es auch anerkannt werden soll, daß eine große Zahl von Autoren mit der Methode von *Kumagawa-Suto* gute Resultate erzielt haben, müssen gewisse prinzipielle Bedenken gegen dieselbe erhoben werden. So ist vor allem gegen die Alkaliverseifung einzuwenden, daß diese allein die Molekel der Eiweißkörper nicht vollkommen desintegriert, und das in ihnen enthaltene „maskierte" Fett der Bestimmung entgehen kann. Daß unter gewissen pathologischen Bedingungen ein Teil der Fettsäuren erst nach vorausgehender Pepsinverdauung der Gewebe ätherlöslich und extrahierbar wird, ist schon von *Bondi*[3]) beobachtet worden. Die Verseifung leidet aber auch an Fehlern, welche die praktische Ausführung der Methode beeinträchtigen. In der Flüssigkeit, die mit Äther ausgeschüttelt werden soll, befinden sich zweifellos viele kolloidale Substanzen, die nicht nur in der wässerigen Schicht bleiben, sondern auch recht häufig als gelatinöse Suspension die Grenzschicht des Äthers einnehmen, von der sie nicht zu trennen sind. Das Filtrieren durch den vorgeschriebenen *Watta*-Asbestfilter gelingt infolge des niedrigen spezifischen Gewichtes des Äthers nur mit Zuhilfenahme der Wasserstrahlpumpe, und es geht mit dem Äther auch die darin emulgierte gelatinöse Masse ins Filtrat. Durch die wechselnde Menge dieser Verunreinigung werden die durch Wägung erhaltenen Werte wesentlich beeinträchtigt, so erhielten wir z. B. in zwei Bestimmungen einer Schweinsleber die immerhin stark abweichenden Werte von 2,97 und 3,30 Proz. Fettsäuren, also eine Differenz von über 10 Proz., die in keinem Verhältnis zur Zeit und Mühe steht, welche jede einzelne Bestimmung mit der Methode erfordert.

---

[1]) Pflügers Arch. 72, 360, 1898.
[2]) Diese Zeitschr. 8, 218, 1908.
[3]) Ebendaselbst 17, 543, 1909.

Wir waren daher bemüht, einen Vorgang zu finden, der neben einer Vereinfachung der Ausführung die praktischen Schwierigkeiten der Fettbestimmung nach *Kumagawa-Suto* vermeidet.

1. Kalkfällung nach Verseifung mit Natronlauge.

Anfangs haben wir versucht, die Verseifung mit Natronlauge als Vorbereitung beizubehalten und die Natronseifen der Fettsäuren vor dem Ausschütteln zu isolieren, um die kolloidalen Substanzen möglichst zu entfernen. Zu diesem Zwecke haben wir die nach der Vorschrift von *Kumugawa-Suto* mit NaOH verseifte Flüssigkeit neutralisiert und nachher mit Kalk gefällt. Es wurde filtriert, die Kalksalze der Fettsäuren wurden vom Filter in eine Glasschale gewaschen, die Kalkseifen durch Zufügen von H_2SO_4 zersetzt und die freie Fettsäuren enthaltende Suspension nach Verreiben mit Na_2SO_4 und Quarzsand im Soxhletapparat extrahiert.

1. Versuch. Drei Parallelversuche. Je 1 g Stearinsäure + 0,5 g Palmitinsäure wurden mit 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose am Wasserbad mit 25 ccm 5 × n NaOH im Becherglas 2 Stunden lang unter einer Glasglocke gekocht. Nachher wurde mit HCl neutralisiert und mit 20 ccm einer 10proz. $CaCl_2$-Lösung gefällt. Es wurde durch ein glattes Filter filtriert, der Rückstand in eine Glasschale gewaschen, mit H_2SO_4 angesäuert und am Wasserbad bis auf 5 ccm verdampft. Der Rückstand wurde mit wasserfreiem Na_2SO_4 und Quarzsand verrieben, die trockene kristallinische Masse in eine Papierhülse gebracht und im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Der Äther wurde in ein abgewogenes Becherglas geschüttet und dieses nach Verdampfen des Äthers und einstündigem Trocknen bei 50° C gewogen. Die erhaltenen Werte waren *1,05*, *1,10* und *1,20 g* Fettsäure anstatt der zugesetzten *1,50 g*.

2. Versuch. Zwei Parallelversuche mit je 1 g Palmitinsäure + 0,5 g Stearinsäure mit Zusätzen von 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose. Vorgang wie bei Versuch 1, gefunden *0,74* und *0,82 g* Fettsäure anstatt *1,50 g*.

3. Versuch. 0,5 g Palmitinsäure + 0,5 g Stearinsäure wie bei Versuch 1, verseift und gefällt. Der Kalkniederschlag am Filter wurde getrocknet und wog 1,10 g. Dann wurde weiter wie bei Versuch 1 verfahren, nach der Extraktion fanden wir *0,45 g* Fettsäure statt *1,0 g*. Mehr als die Hälfte der Fettsäuren muß also bei der Extraktion verlorengegangen sein.

Dieser Vorgang erwies sich, wie Versuche 1 bis 3 zeigen, als durchaus ungeeignet, und Versuch 3 zeigt, daß der Fehler in der Extraktion liegt, indem der Äther die in den Na_2SO_4-Kristallen eingeschlossenen Fettsäuren offenbar nicht gelöst hat. Wir haben daher den Vorgang geändert, indem wir die am Filter gesammelten Kalksalze der Fettsäuren in eine Glasschale spülten und mit einigen Tropfen konzentrierter HCl ansäuerten, die sauer reagierende Suspension etwa 15 Minuten am Wasserbad digerierten und nachher mit Äther ausschüttelten.

4. Versuch. Zwei Parallelversuche mit je 0,5 g stearinsaurem Natrium + 0,5 g ölsaurem Natrium (entsprechend zusammen 0,926 g Fettsäuren). Verseifung und Kalkfällung wie bei Versuch 1. Der Filterrückstand wurde

in eine Glasschale gewaschen, mit HCl angesäuert, 15 Minuten am Wasserbad erhitzt, nachher im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther kam in ein abgewogenes Becherglas, die wässerige Schicht wurde ein zweites Mal mit Äther ausgeschüttelt, der vereinigte Äther am elektrischen Sandbad verdunstet und das Becherglas mit den zurückgebliebenen Fettsäuren nach einstündigem Trocknen bei 50° C gewogen. Wir erhielten nach diesem Vorgang *0,90 g* und *0,88 g* Fettsäuren statt *0,926 g*.

5. Versuch. Drei Parallelversuche. Je 0,5 g Palmitinsäure + 0,5 g ölsaures Natrium (entsprechend insgesamt 0,968 g Fettsäuren) mit Zusatz von 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose. Verfahren wie bei Versuch 4, die erhaltenen Werte waren *0,52 g*, *0,52* und *0,50 g* statt *0,968 g*.

6. Versuch. *0,5 g* Palmitinsäure + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose, bestimmt wie Versuch 4, ergibt *0,50 g* Fettsäure. 0,5 g ölsaures Natrium (= *0,468 g* Ölsäure) + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose, bestimmt wie Versuch 4, ergibt *0,40 g* Fettsäure. 0,5 g Palmitinsäure + 0,5 g Stearinsäure + 0,5 g ölsaures Natrium (= *1,468 g* Fettsäure) + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose, bestimmt wie Versuch 4, ergibt *1,40 g* Fettsäure.

7. Versuch. *2,23 g* Olivenöl + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose, bestimmt wie bei Versuch 4, ergibt *0,85 g* Fettsäure. *2,12 g* Olivenöl + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose, bestimmt wie bei Versuch 4, ergibt *1,00 g* Fettsäure.

Während die bei den Versuchen 4 und 6 erhaltenen Werte zufriedenstellend waren, sind sie bei den Versuchen 5 und 7 viel zu niedrig. Die Ursache war die ungenügende Desintegration durch die Natronlauge, da die aus den Eiweiß- und Dextrosezusätzen bei der Verseifung entstandenen kolloidalen Substanzen bei der Kalkfällung auf dem Filter geblieben sind und eine klare Trennung des Äthers von der wässerigen Schicht verhinderten.

Es erwies sich daher als notwendig, ein Verfahren anzuwenden, bei welchem die kolloidalen Verbindungen des Untersuchungsmaterials vor der Ausschüttelung bzw. Kalkfällung desintegriert werden. Eine weitgehende Desintegration der Eiweißkörper hatte weiterhin den Vorteil, daß alle im Eiweißmolekel etwa maskiert enthaltenen Fettsäuren der Bestimmung zugänglich gemacht werden können.

2. Kalkfällung nach vorausgehender Hydrolyse mit HCl.

Zu diesem Zwecke sind wir folgendermaßen vorgegangen: Das Gemenge von Fettsäuren, Eiweiß und Dextrose wurde mit konzentrierter HCl 9 Stunden lang hydrolysiert, nachher neutralisiert und das alkalisch reagierende Hydrolysat mit Kalk gefällt. Der weitere Vorgang, Filtrieren und Ausschütteln, erfolgt wie bei dem Versuch 4.

8. Versuch. Zwei Parallelversuche. Je 0,5 g Stearinsäure + 0,5 g Palmitinsäure + 0,5 g ölsaures Natrium (insgesamt 1,468 g Fettsäure) wurden mit Zusatz von 2 g Serumglobulin + 1 g Dextrose mit 30 ccm konzentrierter HCl 9 Stunden lang hydrolysiert. Nachher wurde mit 30 ccm 60proz. NaOH neutralisiert, mit Lackmuspapier die alkalische Reaktion festgestellt und nach Auskühlen mit 30 ccm Kalkwasser gefällt. Es wurde nun mit der Nutsche durch ein gehärtetes Filter filtriert, das

Filter bei 110° C getrocknet, der Rückstand in einer Glasschale in Wasser und etwas HCl suspendiert, 15 Minuten am Wasserbad erhitzt, dann in einen Scheidetrichter gebracht und wie in Versuch 4 ausgeschüttelt. Wir erhielten bei Versuch a *1,24 g*, bei Versuch b *1,23 g* Fettsäuren. Da der Verdacht aufgetaucht ist, daß die fehlenden Fettsäuren durch die Saugkraft der Nutsche ins Filtrat gehen konnten, haben wir das Filtrat durch ein glattes Papierfilter ohne Ansaugen filtriert und den Rückstand wie oben verarbeitet. Er enthielt bei Versuch a *0,14 g*, bei Versuch b *0,17 g* Fettsäuren, so daß die Gesamtwerte *1,38* und *1,40 g* waren anstatt *1,468 g*.

Ein dritter Parallelversuch mit denselben eingewogenen Fettsäuremengen, bei dem wir gleich ohne Ansaugen filtrierten, ergab *1,40 g* Fettsäuren anstatt *1,468 g*.

9. Versuch. 0,5 g ölsaures Natrium (*0,468 g* Ölsäure) + 1 g Serumglobulin + 1 g Dextrose ergibt nach dem Verfahren wie bei Versuch 8 *0,42 g* Ölsäure. 1 g Tristearin (entsprechend *0,95 g* Stearinsäure) + 2 g Serumglobulin + 1 g Dextrose ergibt *0,94 g* Stearinsäure.

Nachdem die Vorversuche mit eingewogenen Fettsäuremengen zu befriedigenden Ergebnissen führten, haben wir das Verfahren auf Fettbestimmung in der Leber angewendet, wobei wir die Richtigkeit der erhaltenen Werte durch Zusätze von Fettsäuren kontrolliert haben. Letztere haben wir ermittelt, indem wir von der Summe der erhaltenen Fettsäuren den auf Grund des gefundenen prozentuellen Gehalts berechneten Fettsäuregehalt der eingewogenen Leber subtrahiert haben.

Leber g	Zusatz	Gefundene Fettsäuren g	Gefundene Fettsäuren Proz.	Gefundener Zusatz g
	10. Versuch. Rindsleber.			
24,90	—	0,82	3,30 } *3,40*	—
25,10	—	0,89	3,50 }	—
22,00	*0,50 g* Stearinsäure	1,25	—	*0,50*
24,60	*0,50 g* „	1,34	—	*0,50*
	11. Versuch. Rindsleber.			
20,50	—	0,56	2,73 } *2,67*	—
21,00	—	0,55	2,62 }	—
20,70	0,42 *g* öls. Natr. = *0,39 g* Ölsäure	0,87	—	*0,32*
27,50	*0,50 g* Palmitins.	1,23	—	*0,50*
	12. Versuch. Schweinsleber.			
20,05	—	0,77	*3,87*	—
31,80	*0,50 g* Stearinsäure	1,69	—	*0,49*
	13. Versuch. Rindsleber.			
20,50	—	0,61	3,00 } *3,0*	—
22,60	—	0,68	3,00 }	—
25,10	*0,50 g* Stearinsäure	1,243	—	*0,49*
	14. Versuch. Rindsleber.			
24,80	—	0,821	3,31 } *3,25*	—
25,30	—	0,810	3,20 }	—
33,80	*1,0 g* Stearinsäure	1,853	—	*0,89*

Leber g	Zusatz	Gefundene Fettsäuren g	Gefundene Fettsäuren Proz.	Gefundener Zusatz g
	15. Versuch. Schweinsleber.			
35,50	—	0,847	2,39 } *2,45*	—
40,70	—	1,018	2,50 }	—
32,80	*0,50 g* Stearinsäure	1,283	—	*0,48*
	16. Versuch. Schweinsleber, Fettinfiltration.			
19,60	—	3,332	*17*	—
14,20	0,5 g öls. Natr. = *0,468 g* Ölsäure	2,863	—	*0,450*
9,60	1 g öls. Natr. = *0,936 g* Ölsäure	2,569	—	*0,936*
	17. Versuch. Menschenleber, geringgradige Fettinfiltration, Trockensubstanz 20,4 Proz.			
8,30	—	0,230	2,77 } *2,82*	—
9,40	—	0,270	2,87 }	—
9,30	0,5 g öls. Natr. = *0,468 g* Ölsäure	0,718	—	*0,456*
9,00	1 g öls. Natr. = *0,936 g* Ölsäure	1,160	—	*0,907*
	18. Versuch. Menschenleber, geringgradige Fettinfiltration, Trockensubstanz 22,1 Proz.			
18,40	—	0,682	*3,16*	—
23,70	0,5 g öls. Natr. = *0,468 g* Ölsäure	1,186	—	*0,438*
23,70	1 g öls. Natr. = *0,936 g* Ölsäure	1,660	—	*0,912*
	19. Versuch. Fettleber vom Menschen, Trockensubstanz 22,6 Proz.			
6,30	—	0,280	*4,40*	—
10,55	0,5 g öls. Natr. = *0,468 g* Ölsäure	0,912	—	*0,448*
10,10	1 g öls. Natr. = *0,936 g* Ölsäure	1,340	—	*0,900*

Wie aus den Versuchen 10 bis 19 ersichtlich, waren die mittels Kalkfällung ermittelten Werte bei den Kontrollversuchen gut übereinstimmend, und die zugesetzten Fettsäuren ließen sich nahezu quantitativ nachweisen. Da es mitunter vorkam, daß trotz der vorausgehenden Hydrolyse sich beim Ausschütteln grobe Verunreinigungen in der Ätherschicht angesammelt haben, haben wir den Äther aus dem Scheidetrichter durch Seide filtriert und erst den klaren Äther in das abgewogene Becherglas gebracht.

Zusammenfassend wollen wir nun den Vorgang beschreiben, den wir zur Bestimmung der Fettsäuren in Organen befolgt haben.

8. Beschreibung der Methode.

10 bis 20 g des feuchten bzw. 2 bis 5 g des getrockneten Organs werden in einem langhalsigen Kochkolben von 200 ccm Inhalt ein-

gewogen und in 50 ccm konzentrierter HCl mindestens 9 Stunden lang unter Rückflußkühlung hydrolysiert. Nach Abkühlen wird mit 30 bis 50 ccm 60proz. NaOH neutralisiert und schwach alkalisch gemacht (mit Glasstab und Lackmuspapier prüfen!), sodann nach neuerlichem Abkühlen 30 ccm Kalkwasser hinzugefügt. Nun wird durch ein glattes Papierfilter ohne Ansaugen filtriert, Kolben und Filter mit Kalkwasser nachgewaschen und das Filter am Rande einer Glasschale vorsichtig ausgebreitet. Der Filterrückstand wird vom Papier in die Schale gespült, die Flüssigkeit mit HCl angesäuert und 15 Minuten am kochenden Wasserbad erhitzt. Wenn die Menge der Flüssigkeit zu groß ist, so soll bis auf etwa 50 ccm eingedampft werden. Dann läßt man abkühlen und schüttet die Flüssigkeit in einen Scheidetrichter von 500 ccm Fassungsraum. Die Glasschale wird mit Äther ausgewaschen und der Scheidetrichter mit etwa 150 ccm Äther beschickt.

Der Inhalt des Scheidetrichters wird nun wiederholt kräftig durchgeschüttelt und nach Trennung der Schichten die wässerige Schicht in eine Schale abgelassen, der Äther in ein abgewogenes Becherglas geschüttet. Wenn sich im Äther eine Emulsion bildet, so versuche man dieselbe durch vorsichtiges Schwenken des Trichters in die wässerige Schicht zu treiben. Gelingt das nicht, so muß nach Ablassen der wässerigen Schicht die verunreinigte Grenzschicht des Äthers gesondert abgelassen und durch ein Seidenfilter filtriert werden und nur die obere klare Partie darf durch die obere Trichteröffnung gleich ins Becherglas geschüttet werden. Man bereitet sich das Seidenfilter, indem man in einen Glastrichter von 20 cm Durchmesser einen Glasring (einen Sektor eines kleineren Trichters) einschleifen läßt und zwischen beide ein Seidenstück einzwängt. Nun wird die wässerige Schicht nochmals ausgeschüttelt, der Äther vereinigt und am elektrischen Wasserbad verdampft. Die im Becherglas zurückgebliebenen Fettsäuren werden noch 1 Stunde lang bei 50° C getrocknet und zuletzt gewogen. Ihr Gewicht, multipliziert mit dem Faktor 1,046, ergibt den Gehalt an Neutralfett des untersuchten Organs.

Wenn man sich an den beschriebenen Vorgang hält, ist die Bestimmung des Fettgehalts mehrerer Organe, an denen die Hydrolyse bereits vollzogen ist, binnen 2 bis 3 Stunden bequem durchzuführen. Die Fehlergrenze der Methode hat bei unseren Versuchen 10 Proz. nur sehr selten erreicht, sie betrug bei den gesättigten Fettsäuren im Durchschnitt 1 bis 2 Proz., bei der Ölsäure 5 Proz. Die Methode bietet, um nochmals zu betonen, neben ihrer relativ einfachen Durchführbarkeit den Vorteil, daß bei ihrer Anwendung auch das in den Proteinmolekeln etwa maskiert enthaltene Fett der Bestimmung nicht entgehen kann.

Mikrogesamtjodbestimmung und Jodbestimmung in organischen Säuren.

Von

B. Groák.

(Aus der ersten medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das in der letzten Zeit besonders rege gewordene Interesse für den Jodhaushalt des Organismus hatte eine vielfache Verbesserung und Vereinfachung der Methodik der Jodbestimmungen zur natürlichen Folge. Nichtsdestoweniger bereitete die Bestimmung des organisch gebundenen Jods noch Schwierigkeiten genug, schon wegen der langen Dauer auch der einfachsten Methoden. Die hier zu beschreibende Methode dürfte vielleicht, insbesondere auch in der Abkürzung der Zeitdauer der Bestimmung einen weiteren Fortschritt bedeuten, da mit ihrer Hilfe zwei Parallelbestimmungen innerhalb einer halben Stunde bequem ausgeführt werden können.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt:

1. Bei Abwesenheit von Brom.

Etwa 0,5 bis 0,75 g Natr. carbonic. sicc. und 0,3 bis 0,5 g Kalium nitricum pulv. werden mit der genau abgemessenen, etwa 0,5 bis 1,0 ccm betragenden Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit bzw. der genau gewogenen Menge der Substanz und 0,5 ccm destillierten Wassers in einem Porzellantiegel von 3 × 3 cm Größe über kleiner Flamme am Asbestnetz zur Trockene eingedampft, dann auf freier Flamme zur dunklen Rotglut erhitzt, bis in der Schmelze keine dunkel gefärbten Stellen mehr sichtbar sind, und die anfangs stärkere Gasentwicklung abflaut. Die schwach grünlich[1]) gefärbte Schmelze wird nach dem Erkalten in etwa 5 ccm heißem Wasser aufgenommen und in ein 100 ccm fassendes Erlenmeyerkölbchen übergeführt, in welchem sich 10 bis 15 Glasperlen befinden. Der Tiegel wird mit 15 bis 20 ccm Wasser nachgespült. Nach Abspülen des Kolbenhalses setzen wir 12 bis 15 Tropfen einer kalt gesättigten Kaliumpermanganatlösung hinzu, vermischen durch Umschwenken und kochen den Inhalt kurz

[1]) Durch das in Spuren überall vorhandene Mangan.

auf. Nach etwa 10 Sekunden langem Kochen nehmen wir den Kolben von der Flamme und versetzen die heiße Flüssigkeit mit 5 ccm 25proz. Schwefelsäure, die wir am Anfang vorsichtig tropfenweise zusetzen müssen, da das Gemisch unter Entwicklung von CO_2 und NO_2-Dämpfen stark schäumt. Nach Zusatz der ersten 1 bis 2 ccm wird der Kolbeninhalt in der Regel klar, und nun können wir das Übrige unter Abspülen des Kolbenhalses getrost zufließen lassen.

Der noch heiße Kolben wird wieder über die Flamme gesetzt und eine mit destilliertem Wasser auf das fünffache Volumen verdünnte Kaliumpermanganatlösung bis zur bleibenden, deutlichen Rosafärbung hinzugefügt. Mit dem Zusatz soll noch vor Beginn des Kochens begonnen und bei beginnendem Kochen geendet werden, spätestens ¾ Minuten nach Beginn des Kochens soll die bleibende, schwache Rosafärbung erreicht sein. Nach 10 bis 15 Sekunden langem Kochen setzen wir nun genau 0,1 ccm n/10 Natriumnitritlösung zur kochenden Flüssigkeit, worauf sofortige Entfärbung eintritt, und spülen den Kolbenhals mit Wasser kurz ab. Nach 25 bis 30 Sekunden langem Kochen fügen wir 1 ccm einer 10proz. wässerigen Harnstofflösung hinzu und spülen den Kolbenhals abermals gut ab. (Während dieser ganzen Zeit befindet sich der Kolben über der Flamme, das Kochen soll auch während der verschiedenen Zusätze nicht unterbrochen werden.) Nach weiteren 55 bis 60 Sekunden nehmen wir den Kolben von der Flamme, kühlen in fließendem Wasser stark ab und titrieren das nach Zusatz von 1 ccm 5- bis 10proz. Jodkalilösung und 3 bis 5 Tropfen einer 1proz. Stärkelösung ausgeschiedene Jod aus einer Mikrobürette mit n/100 Thiosulfatlösung. Bei größeren Jodmengen können wir n/50 bzw. n/10 Thiosulfat, und anstatt der Mikrobürette eine *Pregl*sche verwenden. Bei ganz geringen Jodmengen kann eine n/500 Thiosulfatlösung verwendet werden. Den Titer der n/100 Thiosulfatlösung stelle man täglich, den der n/500 nach jeder zweiten bis dritten Bestimmung.

Da das Jod nach diesem Verfahren als Jodsäure bestimmt wird, erhalten wir das Sechsfache der ursprünglich vorhandenen Menge. Einem Kubikzentimeter der n/100 Thiosulfatlösung entsprechen daher 0,0012692/6 = 0,0002115 g = 0,2115 mg Jod.

2. Bei Anwesenheit von Brom.

Die Anwesenheit von Brom stört bei diesem Verfahren hauptsächlich, weil es durch Permanganat in Freiheit gesetzt und dabei Braunstein gebildet wird. Das Verfahren erleidet daher folgende kleine Änderung.

Nach dem Ansäuern mit der Schwefelsäure versetzen wir den Kolbeninhalt noch vor Beginn des Kochens mit Permanganatlösung im Überschuß und fügen nach Beginn des nicht zu heftigen Kochens noch so viel hinzu, bis der Schaum der undurchsichtigen schmutzigbraunen Flüssigkeit deutlich violett schimmert. Dann ist alles Brom in Freiheit gesetzt und durch das Kochen fast augenblicklich ausgetrieben worden. Nun tropfen wir zur kochenden Flüssigkeit eine 10proz. Natriumnitritlösung bis zur vollständigen Entfärbung hinzu und reinigen auch den Kolbenhals und die Wände durch gründliches Abspülen von anhaftenden Braunsteinteilchen. Das ganze Verfahren soll nicht mehr als 2 bis 3 Minuten in Anspruch nehmen.

Nach der eingetretenen Entfärbung versetzen wir nun tropfenweise mit der verdünnten Permanganatlösung bis zur schwachen Rosafärbung, welche, da kein Brom mehr vorhanden, nun bestehen bleibt, und verfahren weiter wie oben angegeben.

Von einer genauen Begründung des Verfahrens möchte ich schon wegen Raummangels absehen. Es sei nur erwähnt, daß die beschriebene Art des Veraschens zugleich auch das Jod oxydiert, und das kurze Kochen mit alkalischem Permanganat ist nur zum vollständigen Oxydieren der letzten Jodspuren eingeschaltet. Das zugesetzte Permanganat oxydiert später auch den größten Teil der beim Ansäuern frei werdenden salpetrigen Säure. Das übrige dient lediglich zur raschen und vollständigen Entfernung des überschüssigen Nitrits und Permanganats. Es konnte auch in direkten Versuchen gezeigt werden, daß ein Kochen mit Nitriten oder mit Permanganat bei dem angegebenen Säuregrad in der in Frage kommenden Konzentration und Zeitdauer auf die Jodsäure keinen nachweisbaren Einfluß hat. Gerade wegen der verhältnismäßig hohen Acidität muß aber nach dem Jodkalizusatz sofort titriert werden.

Zu beachten ist noch folgendes:

Wenn die Werte verläßlich sein sollen, ist peinlichste Sauberkeit zu beobachten. Das gilt auch für sämtliche verwendeten Reagenzien; insbesondere das Kaliumnitrat enthält oft nicht unbeträchtliche Mengen von Jod. Anwesenheit von erheblichen Mengen von Eisen oder Kupfer stört die Bestimmung, das im Blute vorhandene Eisen spielt dagegen keine Rolle.

Das Eindampfen geht leicht und rasch vor sich, da das trockene Carbonatpulver die Flüssigkeit einsaugt. Dies ist besonders bei eiweißhaltigen Flüssigkeiten von großem Vorteil. Schäumen und Spritzen läßt sich bei einiger Sorgfalt stets leicht verhüten. Die angegebene Menge des Pulvergemisches genügt, um etwa 0,5 ccm Flüssigkeit aufzunehmen. Bei Verwendung von größeren Mengen (etwa 1 bis 2 ccm) der zu untersuchenden Flüssigkeit können wir bis zu 1,0 bis 1,5 g Carbonatpulver und, wenn notwendig, auch bis zu 1 g Kaliumnitrat verwenden. Die Menge der zugesetzten Schwefelsäure muß in diesem Falle entsprechend von 5 auf 7 bzw. 8 ccm erhöht werden. Bei an organischen Bestandteilen reichen Flüssigkeiten ist es zur Verhütung heftiger Feuererscheinungen beim Veraschen zweckmäßig, das Carbonat und Nitrat im Tiegel vor dem Zusatz der betreffenden Flüssigkeit mit einem reinen Glasstäbchen gründlich durchzumischen und dann die Flüssigkeit aus der Pipette auf das Pulvergemisch tropfen zu lassen. Die benetzten Stellen der Tiegelwand kann man auch mit etwas Carbonatpulver bestreuen. Es muß noch aufmerksam gemacht werden, daß bei viskösen Flüssigkeiten die Pipette auf die betreffende Flüssigkeit gravimetrisch geeicht werden muß, oder es wird die Flüssigkeit wie auch die festen Substanzen in den Tiegel eingewogen.

Organpulver vermischen wir nach dem genauen Einwägen mit einem Glasstäbchen gründlich mit dem Carbonat-Nitratgemisch und spülen dann das Stäbchen mit 0,5 bis 1,0 ccm Wasser in den Tiegel ab. Frische oder getrocknete Organteilchen werden in das Pulvergemisch eingebettet und mit etwas Carbonatpulver bestreut. Dies genügt in der Regel, nötigenfalls wird aber noch wiederholt mit je 0,2 bis 0,3 g Nitratpulver bestreut.

Bei dem Veraschen müssen Spritzen sowie heftige Feuererscheinungen unbedingt vermieden werden. Man beginne daher das Erhitzen mit kleiner Flamme und steigere es allmählich soweit es notwendig erscheint. Besonders vorsichtig beginne man das Erhitzen beim Veraschen von Blut und

Organen. Hier kann man das Veraschen über dem Asbestnetz beginnen, und erst nach Abklingen der Feuererscheinungen über freier Flamme fortsetzen. Wenn einmal trotz aller Vorsicht einige schwarze Tröpfchen höher an der Tiegelwand haften sollten, ist durch entsprechendes Wenden des Tiegels eine Veraschung auch in ihnen zu erzielen. Das vorsichtigste Veraschen dauert auch nicht länger als etwa 5 Minuten.

Das Aufnehmen der Schmelze geschieht, indem wir den zu drei Viertel mit Wasser gefüllten Tiegel am Asbestnetz über kleiner Flamme vorsichtig erhitzen, Kochen ist wegen drohender Verluste zu vermeiden. Eine Minute nach dem Verschwinden der letzten sichtbaren Spur der Schmelze ist alles mit Sicherheit in Lösung gegangen.

Das Überführen in den Kolben soll sehr sorgfältig geschehen, am zweckmäßigsten, indem man den Inhalt des Tiegels in den Kolben gießt und den in dieser Lage, mit der Öffnung schräg nach unten, verbleibenden Tiegel unter Drehen desselben aus einer kleinen Spritzflasche mit 15 bis 20 ccm Wasser nachspült (vgl. Abb.). Zuletzt wird der Kolbenhals ab-

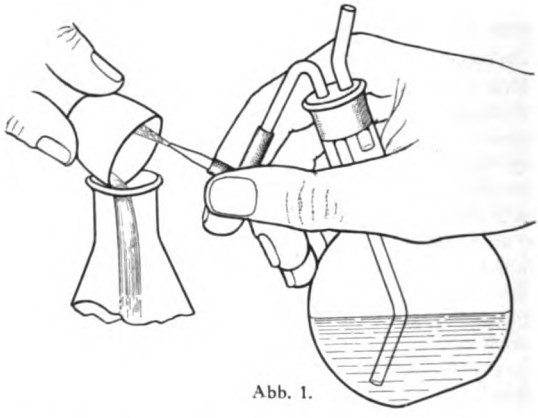


Abb. 1.

gespült. Der Kolbeninhalt darf nur ganz leicht getrübt sein. Nun erfolgt das kurze Aufkochen mit Permanganatzusatz und das Ansäuern; der Kolbeninhalt muß nun wasserklar sein. Sollte sich der Kolbeninhalt beim Ansäuern nicht vollständig entfärben, ist dies ein Zeichen, daß die beim Ansäuern frei gewordene salpetrige Säure zur Reduktion des zugesetzten Permanganats nicht ausreicht. In diesem Falle setzen wir einige Tropfen einer bereitstehenden 10proz. Nitritlösung bis zur vollständigen Entfärbung hinzu und verfahren weiter wie bei spontan eingetretener Entfärbung.

Bei dem nun erfolgenden weiteren Permanganatzusatz soll die Flüssigkeit auch während des Kochens (10 bis 15 Sekunden) deutlich, jedoch nicht zu stark, rosa gefärbt bleiben; die Farbe darf keinesfalls ins Gelbliche umschlagen. Ein Gelb- bzw. Braunwerden tritt ein bei zu großem Permanganatüberschuß, bei zu schwachem Ansäuern, bei Verunreinigungen der Reagenzien, besonders der verdünnten Permanganatlösung, die mindestens zweimal wöchentlich aus der konzentrierten frisch bereitet werden soll[1]),

[1]) Bei dieser Gelegenheit soll auch der Behälter und die Pipette der verdünnten Kaliumpermanganatlösung — am besten mit Nitrit und verdünnter Schwefelsäure — vom Braunstein gründlich gereinigt werden.

Tabelle I. Eingewogen: Kalium jodatum (*Merck*).

	Einwage		Bestimmung															
			In 0,5 ccm Wasser			In 0,5 ccm Wasser 0,1 g Chlor			In 0,5 ccm Wasser 0,05 g Brom			In 0,5 ccm Galle			In 0,5 ccm Blut			In 0,5 ccm Harn			In 0,5 g Muskel		
	KJ	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J	n/100 Thiosulfat	ccm	J
	mg	mg	ccm		mg	ccm		mg	ccm		mg	ccm		mg	ccm		mg	ccm		mg	ccm		mg
1	0,873	0,667	3,14 3,15	3,145	0,665	3,14 3,16	3,15	0,663	3,14 3,16	3,15	0,666	3,13 3,14	3,135	0,663	3,14 3,14	3,14	0,664	3,13 3,15	3,14	0,664	3,14 3,15	3,145	0,666
2	0,742	0,567	2,68 2,66	2,67	0,565	2,67 2,68	2,675	0,567	2,67 2,68	2,675	0,566	2,68 2,69	2,685	0,568	2,67 2,70	2,685	0,568	2,66 2,68	2,67	0,565	2,67 2,68	2,675	0,566
3	1,911	1,460	6,91 6,88	6,895	1,458	6,89 6,87	6,88	1,457	6,89 6,87	6,88	1,455	6,88 6,89	6,885	1,456	6,87 6,89	6,88	1,455	6,86 6,89	6,875	1,454	6,90 6,88	6,89	1,457
4	1,824	1,394	6,58 6,58	6,58	1,391	6,58 6,61	6,595	1,393	6,58 6,61	6,595	1,395	6,58 6,60	6,59	1,394	6,57 6,61	6,59	1,394	6,57 6,57	6,57	1,389	6,57 6,58	6,575	1,390
			n/50			n/50			n/50			n/50			n/50			n/50			n/50		
5	8,544	6,527	15,45 15,40	15,43	6,527	15,40 15,40	15,40	6,514	15,40 15,40	15,40	6,514	15,45 15,40	15,43	6,527	15,40 15,40	15,40	6,514	15,45 15,35	15,40	6,514	15,45 15,45	15,45	6,536

Tabelle II. Eingewogen: Metamonojodbenzoesäure (*Kahlbaum*).

	Einwage			Bestimmung																
				In 0,5 ccm Wasser			In 0,5 ccm Wasser, 0,05 g Brom			In 0,5 ccm Galle			In 0,5 ccm Blut			In 0,5 g Muskel				
	Jodbenzoesäure	Jod	Theor. Jodgehalt	n/100 Thiosulfat	ccm	Jod	Jodgehalt	n/100 Thiosulfat	ccm	Jod	Jodgehalt	n/100 Thiosulfat	ccm	Jod	Jodgehalt	n/100 Thiosulfat	ccm	Jod	Jodgehalt	n/100 Thiosulfat	ccm	Jod	Jodgehalt
	mg	mg	Proz.	ccm		mg	Proz.	ccm		mg	Proz.	ccm		mg	Proz.	ccm		mg	Proz.	ccm		mg	Proz.
1	0,901	0,459	50,98	2,18 2,17	2,175	0,460	51,06	2,17 2,18	2,175	0,460	51,06	2,19 2,18	2,185	0,462	51,28	2,17 2,19	2,18	0,461	51,16	2,18 2,18	2,18	0,461	51,16
2	1,376	0,702	50,98	3,32 3,31	3,315	0,701	50,95	3,30 3,32	3,31	0,700	50,87	3,30 3,31	3,305	0,699	50,80	3,28 3,31	3,295	0,697	50,66	3,33 3,30	3,315	0,701	50,95
3	0,879	0,448	50,98	2,12 2,12	2,12	0,448	50,98	2,12 2,13	2,125	0,449	51,08	2,12 2,13	2,125	0,499	51,08	2,12 2,11	2,115	0,447	50,86	2,10 2,13	2,115	0,447	50,86

und bei Anwesenheit von Brom. Diesen letzten Fall ausgenommen, sind die Resultate nur beschränkt zu verwerten. Bei einiger Sorgfalt läßt sich jedoch dieses Vorkommnis stets mit Sicherheit verhüten.

Bei den nachfolgenden Nitrit- und Harnstoffzusätzen sind die angegebenen Kochzeiten möglichst genau einzuhalten. Nach Beendigung des Verfahrens muß sofort unter Wasser gekühlt werden, der Kolbeninhalt soll etwa 30 bis 50 ccm betragen. Die Jodkalilösung soll, wie bei allen jodometrischen Verfahren, stets frisch bereitet und stets in derselben Menge und Weise zugesetzt werden; nach Zusatz derselben titriere man unverzüglich.

Die mit dieser Methode gewonnenen Werte sollen, in zwei Tabellen zusammengestellt, die Größe der Fehler veranschaulichen.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, bleiben die Fehler der Methode auch bei Mengen von 0,4 bis 0,5 mg Gesamtjod meistens unter 1,0 Proz., erreichen aber höchstens 2,0 Proz. Bei größeren Mengen sind die Fehler entsprechend geringer.

Literatur.

Blum-Gruetzner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**, 429, 1913; **91**, 392, 1914. — *Buchholz*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. **81**, 209, 1917. — *Kendall-Richardson*, Journ. of biol. Chem. **43**, 161, 1920. — *Kendall*, ebendaselbst **43**, 149, 1920. — *Bodo*, diese Zeitschr. **161**, 401, 1925.

Weitere Literaturangaben siehe bei diesen Autoren.

Die Calciumionisation in physiologischen Lösungen.

Von

L. Jendrassik und **E. Moser.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 17. Juni 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Nach den Ergebnissen vielerlei Forschungen der letzten Jahre soll das Calcium in blutähnlich zusammengesetzten Flüssigkeiten nur zum Teil in Ionenform anwesend sein. Hätten im Organismus nur die Ionen eine Wirkung, so wäre dieser Umstand von hoher physiologischer und pathologischer Bedeutung. Die Frage der Calciumionisation ist jedoch in mancherlei Hinsicht umstritten, und zur endgültigen Entscheidung ist noch manche Experimentalarbeit nötig. Wir möchten umstehend einiges hierzu beitragen, und zwar Ergebnisse solcher Methoden, die bisher für diese Zwecke nicht verwendet wurden[1]).

Bevor wir unsere Ergebnisse mitteilen, sei kurz die Geschichte und der gegenwärtige Stand der Frage geschildert.

Es läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz einfacherweise ableiten, daß die Löslichkeit des Calciumhydrocarbonats in bicarbonathaltigen Flüssigkeiten von der Wasserstoff- und Bicarbonationenkonzentration abhängig ist (1). Nach Eintritt des Gleichgewichtszustandes ist die Calciumionenkonzentration mit der Wasserstoffionenkonzentration direkt, mit der Konzentration an Bicarbonationen umgekehrt proportional:

$$(Ca^{\cdot\cdot}) = \text{Konst.} \left(\frac{H^{\cdot}}{HCO_3}\right).$$

Diese Verhältnisse gewannen die gebührende Beachtung durch die Arbeiten von *Rona* und *Takahashi*, die im Jahre 1913 diese Zusammenhänge auch experimentell nachgewiesen haben. Sie mengten Calciumchlorid, Natriumbicarbonat und Salzsäure in verschiedenen Mengenverhältnissen und ließen die Lösungen über das gefällte Calciumcarbonat 2 bis 3 Wochen lang (bei oftmaligem Schütteln) stehen. Endlich bestimmten sie den Gehalt an Calcium, HCO_3 und CO_2 in der Lösung. Aus diesen

[1]) Über vorliegende Arbeit wurde bereits in der Sitzung vom 10. November 1925 der physiologischen Sektion zu Budapest Bericht erstattet (vgl. Orvosi Hetilap, Nr. 49, 1925).

Versuchen ergibt sich die Konstante für Zimmertemperatur zu 350. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Calciumhydrocarbonat auch im Blute in Form einer übersättigten Lösung vorhanden sein muß. Bei einer [$H^{\cdot}$] und [HCO_3'] des Blutes ist der in wirklicher Lösung befindliche Anteil des Calciums etwa ein Fünftel des gesamten [$Ca^{\cdot\cdot}$]. Derartige übersättigte Lösungen sind lange Zeit stabil, wenn sie sich mit dem Bodenkörper nicht berühren. Ebenso muß die Calciumionenkonzentration in blutähnlichen physiologischen Lösungen beträchtlich kleiner sein als der gesamte Calciumgehalt.

Die physiologische und pathologische Bedeutung dieser Verhältnisse haben sodann *Hamburger* und *Brinkman* (3) (4) betont, und nach ihnen haben sich viele andere Forscher mit diesen Fragen beschäftigt. *Hamburger* und *Brinkman* haben die Formel als eine recht genaue betrachtet und dachten, daß der Wasserstoff- und Bicarbonatgehalt auch ohne Berührung mit dem Bodenkörper die Ca-Ionenkonzentration einstellt. Nimmt man den Bicarbonatgehalt der Ringerlösung höher, so wird hierdurch die [$Ca^{\cdot\cdot}$] sogleich der Formel entsprechend erniedrigt. In ihren Arbeiten über die Permeabilität der Niere fanden sie, daß Glucose nur bei höherer $NaHCO_3$-Konzentration der Ringerlösung (Optimal 0,285 Proz.) zurückgehalten wird (3). Für diese Wirkung machen sie nicht die höheren Bicarbonat- oder OH-Gehalte verantwortlich, sondern die Ca-Ionenkonzentration, welche hier im Sinne der *Rona*-Gleichung niedriger sein sollte. Eine ähnliche Auffassung wird vertreten in der Arbeit von *Brinkman* und *van Dam* über die Vaguserregbarkeit des Froschmagens (5), ebenso bei *van Paassen* [über durch Bicarbonate verursachte experimentelle Tetanien (6)].

Diese Gedanken wurden nachher wieder in Deutschland durch eine Reihe anderer Autoren weiter entwickelt [*Freudenberg* (7), *György* (8), *Vollmer* (9) usw.]. Nach der Anschauung von *György* wirkt selbst das gegen Tetanie verabreichte Calcium nur indirekt, da sie die Calciumionenkonzentration des Blutes erst durch Erhöhen der Wasserstoffionenkonzentration steigern kann. Die ursprüngliche *Rona*sche Formel wurde auch erweitert, indem auch das Phosphat als das andere kalkfällende Anion des Blutes eingefügt wurde; *György* (8), *Budde* und *Freudenberg* (10), *Behrendt* (11). Diese letztgenannten Autoren haben die Calciumionisation in bicarbonat- und phosphathaltigen Lösungen auch mittels des chemischen Verfahrens von *Brinkman* untersucht und fanden mit den berechneten sehr gut übereinstimmende Werte. Diese Methode beruht auf der Ermittlung jener Oxalatmenge, welche im gegebenen Flüssigkeitsvolumen zur Hervorrufung einer eben merklichen Calciumoxalattrübung nötig ist. Im Sinne des Massenwirkungsgesetzes ist dieser mit der ($Ca^{\cdot\cdot}$) umgekehrt proportional, indem die Löslichkeit des Calciumoxalats bei den gegebenen Bedingungen als identisch angenommen werden kann.

Dieser strengen Auffassung der Ronaformel wurde in der Literatur öfters widersprochen. In dem Sinne deuten die Versuche von *Sieburg* und *Kessler* (13), nach welchen bei Zufuhr von Calciumsalzen (per os oder intravenös) der Calciumgehalt des Blutes (positiv inotrope Wirkung am Froschherzen) auch mehrere Stunden lang erhöht blieb.

Lorenz (14) und *Blühdorn* (15) bekämpften die Auffassung von *Freudenberg* und *György* in ihrer therapeutischen Beziehung und betrachteten das Calciumion als das wirksame Agens der Calciumsalze. *Maiweg* (16) untersuchte die Frage auch am Froschherzen. Nach seinen Versuchen erniedrigt das Steigern des Bicarbonatgehalts der Ringerlösung die Calciumionen-

konzentration nur sehr wenig. Bei zehnfacher [$NaHCO_3$] erwies sich diese nur mit 20 bis 30 Proz. niedriger. Auch er hegt die Auffassung, daß selbst nach mehreren Stunden die [$Ca^{\cdot\cdot}$] ohne Bodenkörper sich nicht der Formel gemäß erniedrigen kann.

Wir finden daher in der Auffassung der Frage zwischen den verschiedenen Verfassern beträchtliche Unterschiede. Wir glauben, daß dieser Umstand größtenteils durch methodische Unterschiede bedingt ist. Bei dem Verfahren von *Brinkman* wird angenommen, daß die Löslichkeit des Calciumoxalats unverändert ist, durch die anderen anwesenden Stoffe nicht beeinflußt wird. Solange dies nicht einwandfrei zu beweisen ist, können die so erhaltenen Werte nicht als unbedingte Beweise für die Gleichung betrachtet werden. Überdies sind die Formeln von *György, Behrendt* auch theoretisch nicht ganz exakt, wie dies durch *Holló* (16) hervorgehoben wurde. [Eine vollständige Ausarbeitung aller hierher gehörigen Zusammenhänge ist neuerdings durch *Kugelmass* (17) gegeben.]

Andererseits werden die mit biologischen Methoden erhaltenen Gegenbeweise durch die Arbeiten von *Günther* und *Heubner* (18) geschwächt, nach welchen auch unlösliche Calciumsalze in den Geweben als Calcium wirken können. Kolloidales Calcium kann daher eine höhere Ionenkonzentration vortäuschen.

Den eigentlichen Streitpunkt bildet nach den Erwähnten die Frage, *ob die Calciumkonzentration auch ohne Bodenkörper sich der Ronaformel gemäß einstellt.* Wir unternahmen diese Arbeit, weil wir in der *Messung der elektrischen Leitfähigkeit* zur Entscheidung des Problems ein gutes Mittel fanden, welches bisher nicht verwendet wurde. Entsteht in Calcium und Bicarbonat enthaltenden Lösungen kolloidales oder unlösliches $CaCO_3$, so muß sich dies in einer Senkung des Leitvermögens bekunden. Nachdem wir mit diesem Verfahren die Ionisation des Calciums in reinen $CaCl_2$- und $NaHCO_3$-Gemengen ermittelt haben, wiesen wir am *überlebenden Darm* nach, daß diese Verhältnisse auch in physiologisch äquilibrierten Lösungen sich ähnlich gestalten und daß den gefundenen Zuständen tatsächlich eine physiologische Bedeutung zukommt.

1. Leitfähigkeitsmessungen.

Es wurden Mischungen von $CaCl_2$ und $NaHCO_3$ (bzw. $KHCO_3$) hergestellt, ungefähr in solchen Konzentrationen, wie diese Stoffe im Blute bzw. in physiologischen Lösungen vorkommen. Es wurde die spezifische Leitfähigkeit dieser Mischungen bestimmt, und zwar erstens sofort nach ihrer Herstellung, sodann einige Stunden und 24 Stunden später. Wird die Konzentration von Calciumionen durch Bildung von undissoziiertem Ca-Carbonat vermindert, so muß die Leitfähigkeit in entsprechendem Maße abnehmen. Um zu berechnen, wie groß die

Abnahme der Leitfähigkeit sein müßte bzw. welcher $CaCO_3$-Ausscheidung die beobachtete Senkung entspricht, maßen wir auch die Leitfähigkeit reiner $CaCl_2$- und Bicarbonatlösungen von ähnlichen Konzentrationen. Hieraus konnten wir das Äquivalentleitvermögen von Calciumhydrocarbonat, also auch die Leitfähigkeitssenkung bei der $CaCO_3$-Fällung — wenigstens angenähert — berechnen (siehe weiter unten).

In einer Versuchsreihe hielten wir die Lösungen bei Zimmertemperatur, in einer anderen bei 38°, um die Erscheinungen auch bei Körpertemperatur verfolgen zu können. Dieselben Messungen wurden auch bei Anwendung von $KHCO_3$ ausgeführt. Die Messung der Leitfähigkeit geschah in einem Teile der Versuche bei 25°, bei den hier mitzuteilenden Bestimmungen bei 18° in der üblichen Weise mit Verwendung der *Kohlrausch*schen Brücke. Die verwendeten Widerstände wurden durch Vergleich mit geeichten Widerständen von 100 und 1000 Ohm korrigiert. Kapazität des verwandten Gefäßes war zwischen 1,1 und 1,2.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen bestimmten wir mit den einfarbigen Indikatoren von *Michaelis*. Die untersuchten Lösungen hielten wir in Meßkolben mit eingeschliffenen Stöpseln (aus gewöhnlichem Glase), und zwar in einem Teile der Versuche mit einer Schicht flüssigen Paraffins bedeckt, in anderen Versuchen unbedeckt. Nach unseren Versuchen wurde dadurch das Ergebnis im wesentlichen nicht beeinträchtigt.

Die Konzentration an $NaHCO_3$ wurde durch Titration mit einer durch $KHCO_3$ eingestellten n/10 HCl-Lösung bestimmt. Eine Überprüfung der Konzentration von $KHCO_3$-Lösungen war unnötig, da diese sich bekannterweise zuverlässig herstellen lassen. Vor dem Abmessen war das Salz in einem mit CO_2 gefüllten Exsikkator getrocknet. Die Konzentration der $CaCl_2$-Lösungen wurden auf Grund ihrer Leitfähigkeit aus den *Landolt-Börnstein*schen Tabellen berechnet.

Als Beispiele geben wir die Ergebnisse einiger Versuchsreihen in den Tabellen I und II. In der Tabelle III sind dagegen neben den gefundenen Senkungen diejenigen Änderungen der Leitfähigkeit eingetragen, welche zu erwarten wäre, wenn sich die Calciumionenkonzentration der *Rona*-Gleichung gemäß einstellen würde.

Tabelle I.

Nr.	Lösung	Temperatur °C	Spez. Leitvermögen in $Ohm^{-1}\,cm^{-1}\,.\,10^{-4}$ (18°) nach 2'	nach 5h 30'	nach 24h	p_H nach 1/2h	nach 24h
1	0,0108proz. $CaCl_2$ + 0,100proz. $NaHCO_3$	20	10,88	10,86	9,86	7,7	7,7
2	Dasselbe	38	10,88	10,70	9,98		
3	0,0212proz. $CaCl_2$ + 0,200proz. $NaHCO_3$	20	20,88	19,64	19,17	7,8	7,7
4	Dasselbe	38	21,07	19,40	19,17		
5	0,100proz. $NaHCO_3$	20	9,29	9,23	9,17	7,7	7,7
6	0,200proz. „	20	17,85	17,75	17,95	7,8	8,05
7	0,400proz. „	20	34,13	33,62	33,83	—	—
8	0,0217proz. $CaCl_2$	20	4,18	4,19	—	—	—
9	0,0423proz. „	20	7,97	7,93	7,99	—	—

Tabelle II.

Nr.	Lösung	Temperatur °C	Spez. Leitvermögen in $Ohm^{-1}\,cm^{-1}\,.\,10^{-4}$ (18^0) nach 2′	nach 5h 30′	nach 24h	p_H nach $^1/_2$h	nach 24h
10	0,0104 proz. $CaCl_2$ + 0,100 proz. $KHCO_3$	20	11,32	11,23	11,16	7,7	7,7
11	Dasselbe	38	11,52	11,52	11,18		
12	0,0214 proz. $CaCl_2$ + 0,200 proz. $KHCO_3$	20	22,16	21,71	20,35	7,8	7,7
13	Dasselbe	38	22,10	21,82	20,52		
14	0,100 proz. $KHCO_3$	20	9,89	9,89	9,85	7,7	7,7
15	0,200 proz. „	20	19,42	19,23	19,31	7,8	8,0
16	0,400 proz. „	20	36,69	36,67	36,88	—	—
17	0,0209 proz. $CaCl_2$	20	4,05	4,08	—	—	—
18	0,0427 proz. „	20	8,04	8,10	8,04	—	—

Tabelle III.

Nr.	Lösung	Gesamt-[Ca] . 10^{-3}	[Ca″] . 10^{-3} berechnet	Abnahme d. Leitvermögens in $Ohm^{-1}\,cm^{-1}\,.\,10^{-4}$ berechnet	gefunden nach $5^1/_2$h	24h	Bei einer Temperatur gehalten von
1	0,1 proz. $NaHCO_3$ . .	0,965	0,588	0,637	0,02	1,02	20^0
2	+ 0,0108 proz. $CaCl_2$.				0,18	0,90	38
3	0,2 proz. $NaHCO_3$ . .	1,905	0,294	2,630	1,24	1,71	20
4	+ 0,0212 proz. $CaCl_2$.				1,67	1,90	38
10	0,1 proz. $KHCO_3$ . .	0,942	0,700	0,412	$3^1/_2$h 0,09	0,16	20
11	+ 0,0104 proz. $CaCl_2$.				0,00	0,34	38
12	0,2 proz. $KHCO_3$ . .	1,920	0,350	2,610	0,45	1,81	20
13	+ 0,02135 proz. $CaCl_2$				0,28	1,58	38

Um die erwartete Senkung angenähert berechnen zu können, ist die Kenntnis des Äquivalentleitvermögens von Calciumhydrocarbonat bzw. Beweglichkeiten des Ca- und HCO_3-Ions (bei den betreffenden Konzentrationen) notwendig. Die Ausscheidung von $CaCO_3$ erfolgt folgenderweise:

$$CaCl_2 + 2\,NaHCO_3 = CaCO_3 + 2\,NaCl + H_2CO_3.$$

Bei der Ausscheidung jeder $CaCO_3$-Molekel verschwindet daher je ein Ca-Ion und zwei HCO_3-Ionen aus der Lösung. Das frei werdende H_2CO_3 dissoziiert als sehr schwache Säure sehr schlecht, daher kann seine Leitfähigkeit gegenüber den anderen Stoffen vernachlässigt werden. Die Be-

weglichkeit des HCO_3-Ions wurde aus dem Äquivalentleitvermögen von $NaHCO_3$ und $KHCO_3$ berechnet.

Spezifisches Leitvermögen[1]) von 0,1 Proz.
= $1{,}19 \cdot 10^{-2}$ n $NaHCO_3$ ist $9{,}29 \cdot 10^{-4}$ $Ohm^{-1} \cdot cm^{-1} = k_{0,1}$
Äquivalentleitvermögen von 0,1 Proz.
= $1{,}19 \cdot 10^{-2}$ n $NaHCO_3$ ist $78{,}2 = \Lambda_{0,1}$
Spezifisches Leitvermögen von 0,2 Proz.
= $2{,}38 \cdot 10^{-2}$ n $NaHCO_3$ ist $17{,}85 \cdot 10^{-4}$ Ohm^{-1} $cm^{-1} = k_{0,2}$
Äquivalentleitvermögen von 0,2 Proz.
= $2{,}38 \cdot 10^{-2}$ n $NaHCO_3$ ist $75{,}0 = \Lambda_{0,2}$.

Ziehen wir aus diesen Äquivalentleitvermögen die bekannten Werte der Beweglichkeiten des Natriumions ab (40,3 bzw. 38,9 nach den *Landolt-Börnstein*schen Tabellen, 5. Aufl., S. 1105, berechnet), so erhalten wir als Werte der Ionenbeweglichkeiten für HCO_3

in 0,1 Proz. $NaHCO_3$	37,9
„ 0,2 „ „	36,1

Werden diese Werte mit den Beweglichkeiten des Calciums ($\frac{1}{2}$ Ca) summiert (ebenso den *Landolt-Börnstein*schen Tabellen entnommen), so ergeben sich als Werte des Äquivalentleitvermögens von $\frac{1}{2}$ Ca $(HCO_3)_2$

in 0,1 Proz. $NaHCO_3$ + 0,01 Proz. $CaCl_2$ . .	84,8
„ 0,2 „ „ + 0,02 „ „ . .	81,4

Ganz analog bei Verwendung von $KHCO_3$:

in 0,1 Proz. $KHCO_3$ + 0,01 Proz. $CaCl_2$ . .	85,1
„ 0,2 „ „ + 0,02 „ „ . . .	82,9

(In den $KHCO_3$ enthaltenden Lösungen müssen diese Werte etwas höher als bei $NaHCO_3$ liegen, da die Normalität wegen dessen höheren Molekulargewichts niedriger, die Lösung verdünnter ist.) Alle diese Berechnungen sind nur annäherungsweise richtig, weil das Äquivalentleitvermögen des Ca-Hydrocarbonats auf die Ausgangskonzentrationen von (Ca) und (HCO_3) berechnet ist. Diese wurden aber durch die Ausscheidung von $CaCO_3$ vermindert, und bei niederer Konzentration ist das Äquivalentleitvermögen etwas höher.

Die obenstehenden Tabellen zeigen folgendes:

Das spezifische Leitvermögen der untersuchten $CaCl_2$-Bicarbonatgemische unterscheidet sich in den ersten Minuten kaum vom Mittelwert der gemengten $CaCl_2$- und Bicarbonatlösung. In den späteren Stunden zeigt das Leitvermögen eine allmähliche Senkung, was nur durch die Ausscheidung von $CaCO_3$ bzw. Verschwinden von $Ca^{\cdot\cdot}$- und $HCO_3^{\prime}$-Ionen verursacht werden kann.

Nach $3\frac{1}{2}$ bis $5\frac{1}{2}$ Stunden ist die Senkung noch klein, nach 24 Stunden aber ist sie schon beträchtlich und steht nicht weit von der Senkung, welche auf Grund der *Rona*formel zu berechnen ist. (Bei 0,1 Proz. $NaHCO_3$ + 0,01 Proz. $CaCl_2$ war die beobachtete Senkung der spezifischen Leitfähigkeit sogar etwas stärker als die berechnete. Den Grund dieser Abweichung können wir jedoch vorderhand nicht

[1]) Alle bei 18°.

angeben.) Bei weiterer Verfolgung der Leitfähigkeit (48 Stunden) sinkt diese noch weiter und nähert sich noch besser zum berechneten Endwert. In der Tabelle III wurde die beobachtete Senkung aus den Daten der Tabellen I und II dadurch berechnet, daß die in späterer Stunde gefundenen Leitfähigkeiten von den Werten der ersten Messung subtrahiert wurden. Den Ausgangspunkt zur Berechnung der Senkung bildete also der bei der ersten Messung gewonnene Wert. Dieses Vorgehen scheint uns berechtigt, da wir die Ausscheidung der $CaCO_3$ verfolgen wollten, welche nur sehr langsam erfolgt, wie dies aus der allmählichen Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit hervorgeht. Daher wird die in den ersten (3 bis 5) Minuten stattgefundene Senkung nur wenig ausmachen und kann somit wohl vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse zeigen daher, daß in derartigen Mischungen von $CaCl_2$ und $NaHCO_3$, welche im Blute und in physiologischen Salzlösungen vorkommen, die Calciumionenkonzentration dem aus der Ronaformel folgenden Werte sich auch dann nähert, wenn anfänglich kein Bodenkörper vorhanden war. Die Einstellung ist aber eine sehr langsame und ist auch nach 24 Stunden noch nicht vollständig (so bei Zimmer- wie bei Körpertemperatur). *Frisch hergestellte Lösungen haben daher eine höhere Calciumionenkonzentration als alte* (vor mehreren Stunden bereitete) *Lösungen.*

Nach 24 Stunden ist übrigens die Ausscheidung von $CaCO_3$ so stark, daß sie auch mit freiem Auge bemerkt werden kann. Dies beweist entscheidend, daß die Abnahme der Leitfähigkeit hieraus zu erklären ist.

2. Versuche am überlebenden Darm.

Aus dem Vorangehenden folgt, daß die Ca-Ionenkonzentration in blutähnlichen Lösungen mit höherem Bicarbonatgehalt in mehreren Stunden sich bedeutend verändern kann. Dieser Prozeß kann aber schon eine physiologische Bedeutung haben, da isolierte Organe auch gegenüber einer Änderung der [Ca] von 10 Proz. empfindlich sein können. Daß dies tatsächlich der Fall sein kann, haben wir am Kaninchendarm zu zeigen versucht. Die gebrauchte Anordnung war dieselbe wie in unseren früheren an diesem Objekt ausgeführten Untersuchungen (19). Die gebrauchte Tyrodelösung war Mg- und phosphatfrei. In Abwesenheit von Mg ist der Darm gegenüber Ca bedeutend empfindlicher (19) (20).

Der Darm befand sich zu Beginn des Versuchs in einer Tyrodelösung, welche vor 24 Stunden jedoch ohne Glucose bereitet wurde. Die Glucose lösten wir darin frisch vor der Benutzung. Als wir dann diese Lösung mit einer neu bereiteten Tyrodelösung verwechselten, trat immer eine vorübergehende Kontraktur auf. Also der Darm verhielt sich, wie wenn man die Calciumkonzentration der umspülenden Lösung

vermindert hätte. Vergleichende Versuche zeigten, daß an diesem Darme eine Verringerung der Calciumkonzentration auf den $^3/_4$ Teil der ursprünglichen eine etwas stärkere Wirkung hatte als die alte Lösung, eine Verringerung auf den $^7/_8$ Teil aber eine viel schwächere. In der 24 Stunden alten Lösung war daher etwas mehr als der $^3/_4$ Teil des gesamten Calciums in wirksamer Form vorhanden. Bei Rückkehr zur neuen Lösung erfolgte eine vorübergehende Hemmung (Tonus-

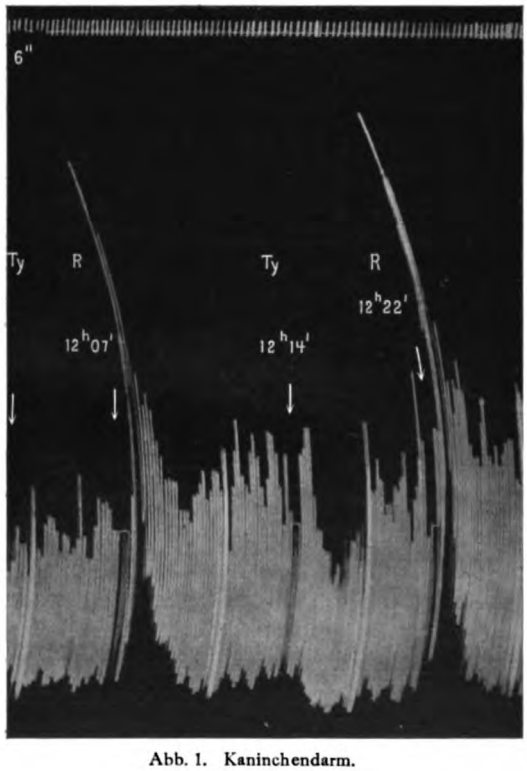


Abb. 1. Kaninchendarm.
Ty = frische,
R = vor 24 Stunden bereitete Tyrodelösung.

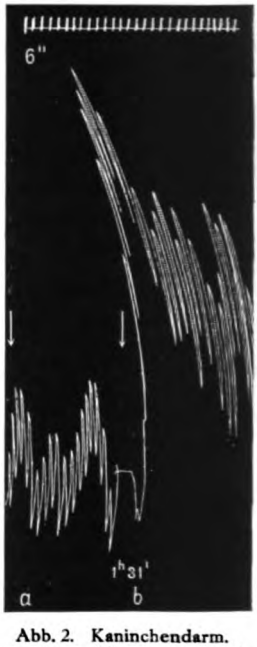


Abb. 2. Kaninchendarm.
a = frische Tyrodelösung mit 0,06 proz. $CaCl_2$-Gehalt,
b = dieselbe vor 24 Stunden bereitet.

abnahme bzw. Verminderung der Bewegungsamplituden), wie dies beim Steigern des Calciumgehalts die Regel ist. (Abb. 1) (Um zu erreichen, daß die beiden Lösungen sich nur in ihrer Calciumkonzentration unterscheiden sollen, bereiteten wir eine Lösung ohne Glucose und ohne $CaCl_2$. Zur Hälfte dieser gaben wir 0,02 Proz. $CaCl_2$ und diese blieb 24 Stunden im Eisschrank. Zur anderen Hälfte fügten wir auch das $CaCl_2$ frisch vor der Anwendung zu.)

Dieser Versuch beweist daher auch, daß in älteren Lösungen die Konzentration des physiologisch wirksamen Calciums eine niedrigere geworden ist. Noch auffallender ist der Unterschied zwischen alter und neuer Lösung, wenn wir den Versuch mit dreifachem Ca-Gehalt (0,06 Proz.) anstellen. Nach Verwendung neuer Lösung ergibt die 24 Stunden alte Lösung eine sehr starke Kontraktur (Abb. 2). Unsere Versuche zeigen auch, daß 3 bis 4 Stunden alte Lösungen (mit 0,1 Proz. $NaHCO_3$) gegenüber frische keine Wirkungsunterschiede aufweisen. In solcher Zeit hat sich daher der Calciumgehalt in derartigen Lösungen noch nicht soweit der Formel genähert, daß dies auch physiologisch bemerkbar wäre. Dies geht auch aus den Resultaten der Leitfähigkeitsmessungen hervor. In $3\frac{1}{2}$ bis $5\frac{1}{2}$ Stunden hat sich die $[Ca^{\cdot\cdot}]$ nur um einen kleinen Teil ($\leqq {}^1/_{10}$) verringert. So kleine Unterschiede sind aber an den *meisten* Darmpräparaten nicht gut nachweisbar. Wir möchten noch erwähnen, daß der physiologische Versuch, wenn dieser auch einen verminderten Calciumgehalt zeigt, sicher als beweisend zu betrachten ist. Wäre die Auffassung von *Günther* und *Heubner* stichhaltig, so würde dieser Versuch den Unterschied nur in vermindertem Maße anzeigen, qualitativ trotzdem richtigerweise.

Die erwähnten Versuche beweisen daher, daß bei der Anwendung der Ronaformel auf reine, Bicarbonat und Ca enthaltende Lösungen der Zeitfaktor sehr vor Augen gehalten werden muß. Ohne das Alter der Lösung zu kennen, kann man über die Ionisationsverhältnisse des Calciums nichts Sicheres aussagen. Andererseits sind auch jene Autoren im Unrecht, nach denen nur bei Anwesenheit ungelöster $CaCO_3$ die $[Ca^{\cdot\cdot}]$ die entsprechende Senkung erleidet. Alle unsere Versuche zeigen das Gegenteil, aber auch mit freiem Auge ist das ausgefällte Carbonat sichtbar.

In welchem Zustande das Calcium im Blute sich befindet, können wir auf Grund dieser Versuche noch nicht entscheiden. Es ist ja fraglich, in welchem Maße die Ionisation des Calciums dem Werte der Ronaformel im Blute sich nähern kann. Es könnten dort Faktoren im Spiele sein, die diese Einstellung befördern, so daß die Übersättigung nicht solange wie in vitro bestehen bleibt.

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von *A. Nietschke*, welche über die Ionisation des Calciums recht überraschende Behauptungen enthält. Auf Grund der *Donnan*schen Gleichungen berechnet dieser Autor aus den Resultaten der Kompensationsdialyse-Versuche, daß das Calcium im Blute in seiner ganzen Menge ionisiert vorhanden sein muß, sogar auch höhere Konzentrationen könnten in Ionenform bestehen. Unsere Versuche beweisen in eindeutiger Weise die Unrichtigkeit dieser Spekulationen.

Zusammenfassung.

Die elektrische Leitfähigkeit von $CaCl_2$ und $NaHCO_3$ enthaltenden Lösungen zeigt nach ihrer Herstellung eine allmähliche Abnahme.

Jedoch auch nach 24 Stunden ist die Senkung gewöhnlich kleiner als diese auf Grund der Formel von *Rona* und *Takahashi* (der $CaCO_3$-Ausscheidung entsprechend) zu berechnen ist.

Eine über 24 Stunden alte Tyrodelösung hat am überlebenden Kaninchendarm derartige Wirkungen, als ob darin der Calciumgehalt sich erniedrigt hätte.

Aus diesen Versuchen wird geschlossen, daß in bicarbonathaltigen, physiologischen Lösungen die Calciumionenkonzentration der Formel entsprechend auch ohne Bodenkörper abnimmt, jedoch dies sehr langsam erfolgt.

Literatur.

1) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., **1**, 70, 1922. — 2) *P. Rona* und *D. Takahashi*, diese Zeitschr. **49**, 370, 1913. — 3) *H. J. Hamburger* und *R. Brinkman*, ebendaselbst **88**, 97, 1918. — 4) *R. Brinkman*, ebendaselbst **95**, 101, 1920. — 5) *R. Brinkman* und *E. van Dam*, Kon. Akad. Wet. Amsterdam, 1922. — 6) *P. van Paassen*, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. **65**, 1162, 1921. — 7) *E. Freudenberg* und *P. György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **96**, 1921; Klin. Wochenschr. **1**, 222, 1922; ebendaselbst **2**, 1539, 1923. — 8) *P. György* und *H. Vollmer*, diese Zeitschr. **140**, 391, 1923; *P. György*, Klin. Wochenschr. **1**, 1399, 1922. — 9) *H. Vollmer*, diese Zeitschr. **140**, 410, 1923. — 10) *O. Budde* und *E. Freudenberg*, Klin. Wochenschr. **3**, 232, 1924. — 11) *H. Behrendt*, diese Zeitschr. **146**, 318, 1924. — 12) *R. Brinkman* und *E. van Dam*, Kon. Akad. Wet. Amsterdam **22**, Nr. 7, 1920. — 13) *Sieburg* und *Kessler*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **96**, 180, 1923. — 14) *H. E. Lorenz*, Klin. Wochenschr. **1**, 2043, 1922. — 15) *H. Maiweg*, diese Zeitschr. **134**, 301, 1923. — 16) *J. Holló*, ebendaselbst **150**, 426, 1924. — 17) *J. N. Kugelmass*, Ber. ges. Physiol. **28**, 323, 1924. — 18) *Günther* und *W. Heubner*, Klin. Wochenschr. **2**, 1603, 1923; **3**, 789, 1924; *W. Heubner*, diese Zeitschr. **145**, 431, 1924. — 19) *L. Jendrassik*, M. Orv. Arch. 1925, S. 1; diese Zeitschr. **148**, 116, 1924. — 20) *L. Jendrassik* und *E. Annau*, ebendaselbst **162**, 207, 1925. — 21) *A. Nietschke*, ebendaselbst **165**, 229, 1926.

Über das Wesen der Autolyse.

VI. Mitteilung:

Die Autoproteolyse ganzer Tierkörper unter verschiedenen Bedingungen.

Von

O. Steppuhn, G. Pewsner und A. Timofejewa.

(Aus dem chemo-pharmazeutischen Forschungsinstitut in Moskau.)

(Eingegangen am 17. Juni 1926.)

Wenn man wieder und wieder die der Organautolyse gewidmeten Seiten des schönen *Oppenheimer*schen Werkes (Die Fermente und ihre Wirkungen) durchblättert, so sieht man, daß man auf diesem Gebiet in dem unentwirrbarsten Dunkel steckt. Es häufen sich die Probleme, von denen das von uns zum Ausgangspunkt genommene — Herkunft, Existenz und Bedeutung der proteolytischen Zellfermente, besonders der Pepsinase — nicht den letzten Platz einnimmt. Man versucht von diesem oder jenem Ende heranzukommen und ist sich dessen bewußt, daß postmortale Prozesse nur verunstaltete Projektionen des in der lebenden Zelle vor sich gehenden Geschehens sind. Mit aller Vorsicht zogen wir unsere Schlußfolgerungen und konnten nur zeigen (V. Mitteilung), daß Jod in vitro und in vivo die proteolytischen Zellfermente *in derselben* Richtung beeinflussen kann. Es sind also in der Zelle wohl dieselben Fermente tätig, die wir vom Autolyseversuch her kennen. Da aber die Jodwirkung unter gewissen Bedingungen sich wie für die Tryptasen, so auch für die Pepsinasen offenbart, so war nicht daran zu denken, das Jod als „Testsubstanz" zu benutzen, um die Frage zu entscheiden, ob in der lebenden Zelle *alle* Proteasen des in-vitro-Versuchs mittun, speziell, ob auch die Pepsinase dort eine gewisse Rolle spielt (IV. Mitteilung).

Wir haben zeigen können, daß die Leber sicher drei verschiedene Proteasen mit verschiedenen Optima besitzt, wir haben es für zu zeitraubend befunden und bedeutungslos für das Grundproblem, alle möglichen Organe auf die Optimalpunkte der Proteolyse hin zu untersuchen; es ist bekannt, daß eine Säuerung bei einem beliebigen auto-

lytischen Vorgang eintritt, wir haben inzwischen — darüber an anderer Stelle — eine große Reihe von Organen bei $p_H = 3$ bis 4 und 7 bis 8 autolysiert und haben keine Ausnahmen gefunden; bei der sauren Pufferung autolysieren alle Organe viel stärker, es ist also wohl eine Pepsinase in allen Organen enthalten. Wir halten es für einen entschiedenen Vorteil, autolytische Versuche nur in Pufferlösungen durchzuführen, nur dann kann man bei Vergleichen von einer Verstärkung oder Abschwächung der Autolyse unter gewissen Bedingungen reden. Tritt bei pathologischen Zuständen, was sicher möglich ist, eine Verschiebung der Gewebsreaktion nach der sauren Seite hin ein, so kann die Autolyse verstärkt sein, was aber ganz anders interpretiert werden muß als eine Anreicherung der Gewebsfermente. *Rona* und *Mislowitzer*[1]) haben es für die Phosphorleber finden können. In solchen Fällen ist die Autolyse in Wasser „verstärkt" gegenüber der Norm, bei Pufferung aber vollkommen normal. Es schien uns von größtem Interesse festzustellen, ob bei Ausschaltung der primären Säuerung, die als Faktor verstärkter Autolyse wirken kann, also eben in Pufferlösungen, eine Verstärkung der Autolyse nach diesen oder jenen Eingriffen in das normale Geschehen des lebenden Organismus zu beobachten ist. Füttert man z. B. ein Tier mit Schilddrüsensubstanz, erhöht dadurch den N-Umsatz der lebenden Zelle, so können Nachklänge einer solchen Erhöhung eventuell auch post mortem bei der Autolyse der Organe erfaßt werden. Arbeiten wir im günstigen Bereich der Pepsinasen und der Tryptasen, so kann man die Verstärkung der Proteolyse für die entsprechenden Fermentgruppen gesondert registrieren. Es wäre damit nicht gesagt, daß die Verstärkung der Lyse, sagen wir bei $p_H = 3{,}5$, *nur* für eine regelrechte Mobilisation des Ferments selbst auch zu Lebzeiten der Zelle sprechen würde, daß *mehr* Ferment vorhanden ist; vieles spricht aber gerade dafür, denn, wenn eine solche Veränderung auf verbesserte Arbeitsbedingungen des Ferments in der Zelle selbst zurückgeführt werden kann, so ist im autolytischen Prozeß die Zelle zerstört und aus ihrem Verbande gelöst.

Wir kommen so zu einer unseren Grundfragen: Wenn wir beobachten, daß bei verändertem, vergrößertem N-Umsatz bei der Autolyse die Pepsinasen in ihrer Aktivität verstärkt sind, so ist Ursache zu glauben, daß sie schon bei Lebzeiten der Zelle gegen die Norm verstärkt arbeiteten, daß somit, trotz des so sauren Optimums, bei dem die Zellproteine eigentlich koaguliert werden müßten, die Pepsinasen an den intracellulären Prozessen teilnehmen.

Diese bei den früheren Mitteilungen unentschiedene Frage wurde zum Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Beiläufig wurden auch

[1]) *P. Rona* und *E. Mislowitzer*, diese Zeitschr. **140**, 517, 1923.

andere angrenzende Versuche angestellt, über die im folgenden berichtet sein mag.

Methodisches.

Es lag keine Möglichkeit vor, alle oder auch nur viele Organe eines Tieres bei zwei Pufferungen normal und unter veränderten Bedingungen zu studieren, eine solche Arbeit, die für uns zu zeitraubend und deshalb undurchführbar ist, wäre besonders interessant, denn es könnten die Veränderungen der Tryptasen- und Pepsinasenaktivität bei verändertem N-Umsatz, oder auch anderen Bedingungen, bis in die einzelnen Organe hin verfolgt werden.

Wir zogen einen kürzeren Weg vor, der aber auch imstande ist, die eigentliche Grundfrage zu klären. Wir autolysierten enthäutete und vom Magendarmtraktus befreite Mäuse in toto. Nach entsprechender Vorbereitung wurde das Tier durch Nackenschlag, in anderen Fällen durch Entblutung (Durchschneidung der Halsgefäße) getötet. Nach Abtrennung der Pfoten und des Schwanzes wurde die Maus sorgfältig enthäutet, wonach der ganze Magendarmtraktus und in einzelnen Fällen auch noch andere Organe entfernt wurden. Nachdem das so vorbereitete Tier sorgfältigst mit Pistill im Mörser zerrieben wurde, stellten wir Emulsionen her, die, wie in früheren Mitteilungen beschrieben, der Autolyse unterworfen wurden.

Die Aufarbeitung des Autolysats und die Bestimmung des Stickstoffs geschahen wie sonst (s. frühere Mitteilungen), jedoch wurde in allen Fällen mit kolloidalem Eisenhydroxyd enteiweißt.

Wir glaubten schon a priori annehmen zu dürfen, daß außer dem Magendarmtraktus auch noch zwei andere Organe bei der Autolyse ausgeschlossen werden müßten, und zwar das Pankreas und die Milz; das erste als Träger der Verdauungstryptasen, das zweite als ein Leucocytendepot. Es kam uns darauf an, die Veränderungen der eigentlichen intracellulären Fermente des „Eigenbedarfs" der Zelle zu studieren. Das Verdauungstrypsin würde bei neutraler oder alkalischer Pufferung derartig dominieren, daß es alle Veränderungen der Zelltryptasen verwischen würde. Es konnte dieses an einer Reihe von Versuchen auch bestätigt werden, allerdings war der Unterschied nicht gar groß, aber augenfällig (Tabelle I). Es hat sich gezeigt, daß verschiedene Tierserien aus verschiedenen Bezugsquellen schon in der Norm abweichende Zahlen geben, insofern mußte die Norm, wenn nötig, wieder und wieder bestimmt werden.

Tabelle I. Mausserie A. Dauer der Autolyse 48 Stunden.

Charakteristik des Versuchs	Versuchs-Nr.	Proteinzerfall in Proz.	
		$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$
Pankreas und Milz im Autolysat	1	32,6	43,1
	2	49,4	52,6
	3	52,3	60,0
	Mittel:	45,1	51,9
Pankreas und Milz entfernt . . .	4	40,5	36,0
	5	41,3	31,9
	6	45,9	19,5
	7	39,8	30,0
	Mittel:	41,9	29,3

Man ersieht aus der Tabelle I, daß im sauren Puffer die Autolyse sich nicht verändert hat, es sind die entfernten Organe nur besonders reiche Träger von Tryptasen. Bei erhaltenen Pankreas und Milz verläuft die Autolyse bei $p_H = 7{,}1$ sogar bedeutend stärker als bei $p_H = 3{,}8$, was sonst für die einzelnen Organe nie zu beobachten ist. Entfernt man aber Pankreas und Milz, dann dreht sich das Verhältnis sofort um. Man sieht auch, wie bedeutend mehr die Zahlen unter Erhaltung des Pankreas schwanken. Die Menge der Verdauungstryptasen im Organ im gegebenen Moment hat ausschlaggebende Bedeutung. In einem besonderen Versuch sahen wir, daß die Milz mit ihren Leucocyten immerhin auch Bedeutung für den Verlauf des beschriebenen Versuchs hat. Die *Anreicherung* an Leucocyten und ihr *Zerfall* an *einer* Stelle, die Möglichkeit, auch anderes Eiweiß abzubauen, das gewissermaßen *heterolytische Vermögen*, bestimmt die Bedeutung der leucocytären Verdauung. Räumen wir mit der Milz auch Leucocyten weg, so haben wir einen Faktor einer heterotryptischen Verdauung weggeräumt, und die Proteolyse sinkt bei $p_H = 7{,}1$ auf eine Zahl, die *niedriger* ist als bei $p_H = 3{,}8$, was bei erhaltenen Pankreas und Milz im Autolysat niemals vorkommt.

Tabelle II.

Mausserie K. Dauer der Autolyse 48 Stunden.

Charakteristik des Versuchs	Versuchs-Nr.	Proteinzerfall in Proz.	
		$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$
Pankreas und Milz im Autolysat . .	1	59,0	62,8
Pankreas entfernt	2	66,8	44,3
Pankreas und Milz entfernt	3	68,0	27,2

Wir entschlossen uns somit, bei allen weiter folgenden Versuchen Pankreas und Milz nicht mitautolysieren zu lassen, diese Organe waren also im weiteren immer entfernt.

Hunger. Ohne Nahrung verhungern Mäuse sehr rasch; bei völligem Nahrungsmangel überlebt die Maus selten einmal den fünften Hungertag; gewöhnlich ist das Tier aber schon nach 2 bis 3 Tagen moribund. Es ist deswegen kaum möglich, *die Stadien* der Proteolyseschwankungen in der Hungerperiode zu fassen — also eventuell die initiale Verstärkung, die lange Periode der Unveränderlichkeit und den prämortalen Eiweißzerfall —, entsprechend dem gewöhnlichen Harnbild des Hungerstoffwechsels z. B. am Hunde. Sollten solche Schwankungen auch an der Maus existieren, und könnte man einen Widerhall im autolytischen Prozeß auch feststellen, so könnte das nur durch eine sehr große Versuchsreihe entschieden werden, da die ganze Periode kurz ist und die individuellen Schwankungen zu bedeutend sind. Wir wählten

gerade dasjenige Stadium, wo das Tier, äußerlich wenigstens, in das prämortale Stadium trat, und dieses geschah einmal sogar schon nach 24 Stunden.

Es liegen verschiedene Beobachtungen über die Autolyse an Organen von Hungertieren vor, soviel uns bekannt, wurden aber niemals ganze Tierkörper in verschiedenen optimalen Bereichen autolysiert. Bei der von uns angenommenen Arbeitsweise konnten wir darüber Schlüsse ziehen, ob, wenn die Autolyse beim Hunger verstärkt ist, dieses auf Kosten einer Säuerung der Gewebe geschieht *(Bradley)*.

Eigentlich sollte gerade in diesem Falle die Autolyse nicht verstärkt sein, da ja in Pufferlösungen gearbeitet wurde.

Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Mausserie A.

Versuchs-Nr.	Zeit in Tagen	Proteinzerfall in Proz.	
		$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$
1	1	36,5	38,5
2	2	33,1	42,2
3	2	38,4	36,8
4	3	48,2	38,2
5	4	38,4	46,6
Mittel . . .	—	38,9	40,5
Norm . . .	—	43,7	29,6

Aus der Tabelle III sieht man, daß die Autolyse tatsächlich erhöht ist, und zwar trotz *Pufferung* im alkalischen Bereich der Tryptasen. Somit ist es nicht gut möglich, *nur* die Säuerung der Gewebe beim Hunger für die verstärkte Autolyse verantwortlich zu machen. Wir haben es für möglich gefunden, das Mittel zu ziehen, da trotz verschiedener Hungerperioden alle Tiere in demselben Stadium des Allgemeinzustandes verarbeitet wurden, und man sieht deutlich, daß die Verdauung bei $p_H = 7{,}1$ steigt; für $p_H = 3{,}8$ liegen die Zahlen etwas zu dicht bei der Norm, um dasselbe zu behaupten. Jedenfalls ist es klar, daß nicht nur Säuerung der Gewebe Ursache der verstärkten Autolyse von Hungerorganen ist, sondern, unabhängig vom Milieu, eine Aktivierung der Fermenttätigkeit selbst.

Schilddrüsenfütterung. Die Beeinflussung des N-Umsatzes durch Schilddrüsenfütterung ist allgemein bekannt, desto interessanter war es zu untersuchen, ob bei Pufferung, also unabhängig von einer eventuellen Säuerung der Gewebe, die Autolyse in vitro verstärkt wird, d. h. ob Proteasen direkt mobilisiert werden, oder ihre Aktivität gesteigert wird. Wir sahen, daß im prämortalen Hungerstadium gerade die Tryptasen aktiver arbeiten; es war zu entscheiden, ob auch bei Schilddrüsenfütterung dieses der Fall ist.

Wir verfütterten getrocknete Schilddrüse den Mäusen mit Zwieback vermischt und verarbeiteten die Tiere in verschiedenen Zeitabständen danach (2 bis 13 Tage). In der Tabelle IV sind die Resultate zusammengestellt. Die Tiere werden gewogen, der Gewichtssturz in Prozenten ist in der Tabelle vermerkt.

Tabelle IV.

Mausserie A.

Versuchs-Nr.	Tage der Wirkung	Gewichtssturz Proz.	Proteinzerfall in Proz.	
			$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$
1	2	6,1	44,5	31,8
2	2	8,4	50,9	42,9
3	2	6,1	50,15	42,7
4	4	11,5	57,0	42,5
5	4	11,8	56,0	32,8
6	4	6,9	56,3	39,4
7	6	18,5	56,5	49,8
8	8	20,0	46,8	41,3
9	11	29,3	60,0	65,5
10	13	28,8	65,5	48,7

Wir berechnen hier nicht die Mittelzahlen für alle Versuche, da die Fütterungszeiten verschieden sind. Aber ein Blick auf die Tabelle IV genügt, um zu erkennen, daß hier wie im alkalischen so auch im sauren Bereich die Proteolyse gegenüber der Norm verstärkt ist, und zwar steigt die Fermentaktivität ziemlich gleichsinnig mit der Fütterungsdauer, um in den beiden extremen Nummern ein gewaltiges Maximum zu erreichen; wir glauben überhaupt die Grenze der möglichen Autolyse unter gegebenen Verhältnissen (Anhäufung der Spaltprodukte!).

Wir sehen also hier mit aller Deutlichkeit, daß die im sauren Bereich arbeitenden Pepsinasen, deren Optimum für die Leber wenigstens etwa $p_H = 3{,}5$ ausmacht, unter gewissen Bedingungen gewaltig aktiviert werden, somit also wohl auch im normalen Zustande Arbeitsgelegenheit haben, denn es ist ja nicht anzunehmen, daß diese Aktivierung nicht bereits im lebenden Organismus bestand, sondern erst im Glase manifest wird.

Die Annahme, daß, wenn Pepsinasen arbeiten, sie es nicht unter optimalen Bedingungen, was Wasserstoffionenkonzentration betrifft, tun, wäre widersinnig, der Organismus wird nicht über Vorrichtungen verfügen, die er, wenn es keine Rudimente sind, nicht ausnutzen kann. Dann muß man aber auch die Konsequenz akzeptieren, daß Wasserstoffionenkonzentrationen, die dem Optimum der Pepsinasen, also $p_H = 3$ bis 4, entsprechen, in der Zelle vorliegen können. Mag sein, daß Anhäufungen von Wasserstoffionen an der Grenzschicht zweier Phasen, Protein und Dispersionsmittel, also an der Protoplasmagrenzschicht, im weiteren Sinne des Wortes zustande kommen. Eine „Denaturierung"

des Proteinteilchens an der Grenzschicht durch solche Säuerung ist vielleicht gerade eine Vorbedingung der ausgiebigen Verdauung durch Pepsinase.

Es ist selbstverständlich, daß die bei der Hyperfunktion der Schilddrüse oder bei Schilddrüsenfütterung beobachteten Intoxikationen durch die Wirkung der dabei in Massen entstehenden Spaltprodukte der Proteine verursacht werden können.

Phosphorvergiftung. Daß bei Phosphorvergiftung, wo der Eiweißumsatz stark zunimmt und Aminosäuren in beträchtlichen Mengen ausgeschwemmt werden, auch die Organautolyse verstärkt sein darf, ist wohl zu erwarten. Tatsächlich hat eine Reihe von Autoren eine gesteigerte Autolyse der Phosphorleber beobachtet.

Neuerdings hat *P. Rona* mit seinen Mitarbeitern[1]) zeigen können, daß die Phosphorleber, in gepufferten Medien autolysiert, keine anderen Zahlen ergibt wie die normale Leber; die verstärkte Autolyse soll nur auf erhöhte Säuerung des Gewebes zurückzuführen sein, die bei Phosphorvergiftung eintritt. Tatsächlich hat *P. Rona* (l. c.) zeigen können, daß die normale und die phosphorvergiftete Leber beim Fortschreiten der Autolyse differierende H^+-Konzentrationen zeigen; nach 50 Stunden z. B. für die normale Leber $p_H = 6{,}58$, für die Phosphorleber etwa 6,1.

Wenn dieses für die Leber gilt, so sind die Verhältnisse beim Autolysieren des ganzen Körpers sicher andere. Eben die Leber erleidet bei Phosphorvergiftung tiefgehende Veränderungen. Im Verhältnis zum Gesamtkörper macht die Leber nur einen geringen Teil des Gesamtgewebes aus, und da kann man sicher sein, daß die gar geringe Erhöhung der Säuerung im Autolysat durch das andere Gewebe gepuffert wird.

Wie aus der Tabelle V zu ersehen ist, konnten auch wir eine Verstärkung der Autolyse in Wasser beobachten. Bei Pufferung $p_H = 3{,}8$ ist keine vermehrte Spaltung nachzuweisen [in einem Versuch (3a) sogar eine Verminderung]; dagegen ist eine deutliche Verstärkung im alkalischen Bereich bei $p_H = 7{,}1$ zu verzeichnen, welche viel bedeutender ist als im Wasser. Wir ziehen daraus den Schluß, daß die im Wasser beobachtete Verstärkung *in unserem Falle* gerade nicht auf erhöhte Säuerung zurückzuführen ist, sondern auf erhöhte Aktivität der Tryptasen, die bei gewöhnlicher Autolyse, besonders am Anfang, bei $p_H = 6{,}7$ bis 6,8, genügend wirksam sind. Bei gewöhnlicher Leberautolyse ist der Proteinzerfall in Wasser (durch Säuerung) eben immer stärker als im alkalischen Bereich; in unserem Falle sind die Zahlen umgekehrt bei $p_H = 7{,}1$ immer größer als in Wasser.

Es ist bezeichnend, daß bei Hunger und Phosphorvergiftung, wo man von einer „Acidosis" spricht, gerade diese Acidosis nicht auch die Ursache eines vermehrten Proteinzerfalls ist, sondern vielleicht im Gegenteil Schutzvorrichtung gegen erhöhten Eiweißzerfall bei

[1]) *P. Rona, Mislowitzer* und *Seidenberg*, diese Zeitschr. **146**, 26, 1924.

normaler Zellreaktion bedeutet. Denn eben in diesen beiden Fällen ist die erhöhte Aktivität der Tryptasen augenscheinlich.

Tabelle V.

Mausserie A. Einmalige Injektion von 0,2 ccm 0,2proz. Phosphorlösung in Paraffinum liquid. Nach 24 Stunden treten immer auch makroskopisch sichtbare Veränderungen der Leber auf. Verarbeitung, wie gewöhnlich, nach 24 Stunden.

Versuchs-Nr.	Proteinzerfall in Proz.			Dauer der Autolyse in Stunden
	$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$	Wasser	
1	45,2	34,2	—	48
2	40,7	—	—	48
3a	29,0	46,3	44,0	48
3b	33,4	52,8	52,8	96
4a	48,2	43,0	40,8	48
4b	54,7	52,7	44,1	96
Mittel für 48-Stdn.-Versuche .	40,7	40,1	42,4	48
Norm	43,7	29,6	37,3	48

Arbeit und Ruhe. Es ist nun wohl mit Sicherheit festgestellt, daß der größte Teil aktiver Muskelarbeit auf Kosten der Kohlehydrate bewältigt wird; sicher kommen gemeinsame Zwischenstufen des Kohlehydrats und Fettabbaues mit in Betracht, damit kann von einer Verwertung der Fette als Energiequelle gesprochen werden, und zwar bei Arbeitsleistung *(Krogh)*. Was die Proteine anbetrifft, so liegt die Sache nicht so ganz auf der Hand. Es wird nämlich, wie es scheint, der Ruheumsatz hauptsächlich gerade auf Kosten der Proteine gedeckt; nun ist der Ruheumsatz teilweise aber auch eine aktive Arbeitsleistung und Muskelkonzentration (*H*erz), andererseits ist auch aktive Arbeitsleistung auf Kosten reiner Proteine beim obligaten Fleischfresser möglich *(Pflüger)*.

Vom rein theoretischen Standpunkt aus ist es gar nicht anders denkbar, daß, wenn auch die Muskelkontraktion *vor allen Dingen* auf Kosten der Kohlehydrate und eventuell Fette zustande kommt, der ganze Stoffumsatz mit in Bewegung gerät, verstärkte Proteolyse, verstärkte Desaminierung usw. auftreten; diesbezügliche Tatsachen sind ja auch reichlich bekannt. Kann die energetische Auswertung der Eiweißstoffe eben erst bei desaminierten Abbaustufen beginnen, so ist eine Verarmung des Energiegewinnes für einen solchen Prozeß charakteristisch. Es spricht vieles dafür, daß der Unterschied zwischen Kohlehydraten einerseits und Fetten und Proteinen andererseits kein scharf prinzipieller, also qualitativer, sondern quantitativer ist.

Von diesen Standpunkten aus hielten wir es für lohnend, die Autolyse bei Arbeit und Ruhe zu untersuchen.

Auch in diesem Falle untersuchten wir Mäuse in toto, wie früher beschrieben. Es wurden dreierlei Zustände verglichen: Vollkommene Ruhe, freie Bewegung und Zwangsarbeit im Verlauf von 2 bis 4 Stunden bis zur Erschöpfung. Die „Ruhemäuse" wurden in eine kleine Holzschachtel gesetzt, so, daß durch die Einschiebedeckel der Kopf gerade

frei fixiert war; außer ganz geringen Kopfbewegungen konnte die Maus keinerlei Muskelarbeit leisten.

Die zweite Serie der Mäuse wurde mitten aus der *freien* Bewegung heraus in Verarbeitung genommen; selbstverständlich wurden auch diese Mäuse wie die „Ruhemäuse" und „Arbeitsmäuse" während des Versuchs nicht gefüttert.

Die Arbeitsmäuse mußten, wie gesagt, in einem speziell konstruierten Apparat 2 bis 4 Stunden bis zur Erschöpfung laufen. Die Erschöpfung der Arbeitskraft war leicht daran zu erkennen, daß die Maus aufhörte, dem Rade laufend zu folgen und sich öfter und öfter überschlug. Nach etwa 2 Stunden Arbeit waren die Mäuse gewöhnlich erschöpft und transpirierten stark.

Die Resultate der Versuche sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

Diese Reihe wurde im Winter ausgeführt und mit einer neuen Tierserie, die wir mit „S" bezeichnen. Die Autolyse dauerte 48 Stunden.

Tabelle VI. Tierserie S.

Charakteristik des Versuchs	Versuchs-Nr.	Proteinzerfall in Proz.	
		$p_H = 3{,}8$	$p_H = 7{,}1$
Freie Bewegung im Glaskasten . .	1	54,2	45,8
	2	58,3	49,3
	3	60,0	50,0
	4	45,0	30,0
	5	54,1	33,3
	6	47,8	37,8
	7	46,0	36,0
	Mittel:	52,2	40,0
Zwangsarbeit im Drehrade bis zur Erschöpfung (2 bis 4 Stunden)	1	48,3	28,9
	2	48,7	41,9
	3	46,3	35,0
	4	50,0	45,5
	5	50,0	42,0
	6	46,0	37,5
	7	37,4	40,7
	8	48,0	44,0
	9	41,3	44,8
	10	50,0	50,0
	11	45,7	41,6
	12	37,5	33,3
	Mittel:	45,8	40,4
Ruhemäuse	1	47,3	19,5
	2	53,8	30,8
	3	54,2	37,5
	4	35,7	33,9
	5	47,7	17,4
	6	58,3	39,5
	7	53,7	36,8
	Mittel:	50,1	30,8

Wie die Tabelle zeigt, schwanken die Werte immerhin recht beträchtlich; die ansehnliche Zahl der Versuche gestattet jedoch, gewisse Schlüsse zu ziehen. Man kann wohl mit Sicherheit behaupten, daß bei den Ruhemäusen die Proteolyse im Tryptasebereich geringer ist als bei freier Bewegung und Arbeitsleistung. Freie Bewegung und Zwangsarbeit ergeben denselben Wert, man muß deswegen glauben, daß die große erschöpfende Muskelleistung ohne verstärkte Proteolyse vor sich geht. Müßte der Sprung von Ruhe zur freien Bewegung doch auf Kosten verstärkter Muskelkontraktionen geschrieben werden, dann wäre ein weiterer Sprung von freier Bewegung zur Zwangsarbeit zu erwarten. Dieses tritt nicht ein. Unwillkürlich erwecken diese Tatsachen den Eindruck, als ob bei freier und leichter Arbeitsleistung verstärkte Eiweißspaltung *noch* notwendig ist, wozu die Tryptasen im geringen Grade mobilisiert werden. Bei einem gewissen Grade der Arbeitsleistung tritt das bekannte eiweißsparende Bild in Erscheinung, und erhöhte Arbeitsleistung geht ohne weiteren Aufwand von Proteinenergie vor sich. Dieses wird durch die Betrachtung der Werte bei $p_H = 3{,}8$ weiter bekräftigt; bei Zwangsarbeit hat die Proteolyse im sauren Bereich sogar Tendenz einer Abschwächung, geschweige denn einer Verstärkung. Auch diese in-vitro-Versuche bekräftigen also die Tatsache, daß Arbeitsleistung als aktive Muskelarbeit nicht mit ausgiebigen proteolytischen Prozessen einhergeht. Im initialen Stadium des Energieaufwandes tritt eine geringe Verstärkung der Proteolyse ein; bei weiterer Belastung bleibt die Proteolyse auf demselben Niveau im Tryptasebereich und fällt gar in dem sauren Bereich, was als Eiweißsparung aufgefaßt werden kann.

Zusammenfassung.

1. Es werden Versuche über Autolyse ganzer Tierkörper nach verschiedenem Lebensregime beschrieben, und zwar bei zwei Pufferungen, im Bereich der Pepsinasen ($p_H = 3{,}8$) und im Bereich der Tryptasen ($p_H = 7{,}1$).

2. Mitautolysieren von *Pankreas* und *Milz* führt zur verstärkten Verdauung im Tryptasebereich, was mit dem polylytischen Vermögen des Trypsins und der leucocytären Tryptasen in Verbindung steht.

3. *Nach Hunger* ist die Autolyse im prämortalen Stadium im Tryptasebereich erhöht, somit ist die erhöhte Autolyse nach Hunger nicht durch Gewebssäuerung zu erklären.

Schilddrüsensubstanz führt zur gewaltigen Verstärkung der Fermentarbeit wie im sauren, so auch im alkalischen Bereich. Eine solche Mobilisation der Pepsinasen unter veränderten Bedingungen führt zu

dem Schluß, daß die Tätigkeit auch im normalen Zustand bereits besteht und nach Schilddrüsenfütterung nur verstärkt wird. Sollte die Pepsinasearbeit im optimalen Bereich (also $p_H = 3$ bis 4) verlaufen, was sicher der Fall ist, so *muß* eben eine Denaturierung des Proteins durch eintretende Säuerung (Anhäufung von H^+ an den Grenzschichten) als Vorbedingung einer ausgiebigen Spaltung angenommen werden.

4. *Bei Phosphorvergiftung* kann nur erhöhte Aktivität der Tryptasen beobachtet werden; somit kann erhöhte Gesamtautolyse ganzer Tierkörper nicht durch erhöhte Säuerung erklärt werden.

5. *Arbeit* führt zur initialen Mobilisation von Tryptasen; bei weiterer Arbeitsbelastung wird die Proteolyse nicht weiter verstärkt; es tritt die Eiweißsparung in den Vordergrund.

Über Ureasebildung durch Bakterien bei Nichtvorhandensein von Harnstoff.

Von

L. Rubentschik.

(Aus dem mikrobiologischen Laboratorium des wissenschaftlichen Forschungsinstituts in Odessa, Ukraine.)

(Eingegangen am 18. Juni 1926.)

1920 haben wir aus dem Chadjibeyliman (neben Odessa) sechs neue Urobakterienarten (Urobacillus psychrocartericus, Urobacillus hesmogenes, Urobacterium citrophilum, Urobacterium aerophilum, Urosarcina psychrocarterica) isoliert, die genau untersucht worden sind[1]). Einige von denselben erwiesen sich als kräftige Harnstoffspalter. So vergären die ersten drei Arten 5 Proz. Harnstoff in Fleisch-Pepton-Bouillon bei 20 bis 24° C binnen 25 bis 29 Stunden. Jedoch bei Vorhandensein von 10 Proz. Harnstoff wird der letztere nach 9 bis 11 Tagen völlig vergoren. Das Urobact. citrophilum zersetzt 5 Proz. Harnstoff in 7 bis 8 Tagen, während in Bouillon mit 10 Proz. Ureum die Gärung stehen bleibt, wenn noch etwa 65 Proz. der anfänglichen Harnstoffmenge nicht vergoren sind. Was die Urosarcina psychrocarterica anbetrifft, so zersetzt sie in Bouillon mit 5 Proz. Harnstoff etwa 90 Proz. der dort vorhandenen Harnstoffquantität nach 8 bis 9 Tagen. Bei 10 Proz. Ureum beläuft sich die Menge des vergorenen Harnstoffs nur auf etwa 30 Proz. Die schwächste von den obengenannten Bakterien ist das Urobact. aerophilum, bei dem die Gärung in Bouillon mit 5 Proz. Harnstoff aufhört, wenn etwa 55 Proz. der ursprünglichen Ureummenge zersetzt sind. Bei einer Konzentration von 10 Proz. Harnstoff werden nur etwa 11 Proz. des letzteren vergoren.

Bekanntlich ist die Harnstoffgärung ein Prozeß, der unter der Einwirkung von Urease vor sich geht. Dieses Ferment wurde bei ver-

---

[1]) *L. Rubentschik*, Centralbl. f. Bakt. 2, 64, 166, 1925; 2, 65, 1, 1925; 2, 66, 161, 1925/1926; 2, 67, 167, 1926.

Tabelle I.

Dreitägige Kultur des Urobac. psychrocartericus in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig vergoren, wird zu je 10 ccm in sechs Stöpselprobiergläser eingegossen. Dann werden in jedes Probierglas 1 Gewichtsprozent Toluol und nach 24 Stunden 200 mg Harnstoff hinzugefügt. Eins von diesen Probiergläsern wird gleich nach dem Harnstoffzusatz mit 0,2 n HCl abtitriert, die übrigen fünf aber nach dreistündigem Aufenthalt im Thermostaten bei 45 bis 47° C. Als erste Kontrolle dient dieselbe Bouillonkultur mit Toluol, jedoch ohne Harnstoffzusatz. 10 ccm dieser Kontrollkultur werden am Anfang des Versuchs titriert; die anderen 10 ccm nach dreistündigem Stehen im Thermostaten. Als zweite Kontrolle wird sterile Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff verwendet. Diese Bouillon wird auch am Anfang des Versuchs, sowie nach dreistündigem Aufenthalt im Thermostaten titriert.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2 n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs **)	
		Versuch *) ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anfang des Versuchs	a	19,0			
	b		1. 19,0		
	c		2. 3,0		
	d				
	e				
	f				
Nach 3 Std.	b	52,3		199,8	
	c	52,2	1. 19,0	199,2	
	d	52,4	2. 3,0	200,4	199,9 †)
	e	52,35		200,1	
	f	52,4		200,4	

*) Spezielle Analysen zeigten, daß Toluol wirklich alle Bakterienkeime abgetötet hatte und daß die Kulturen bis zum Ende des Versuchs steril blieben. Dasselbe wurde auch bei allen unten angeführten Versuchen beobachtet.

**) Die Menge des zersetzten Harnstoffs wurde nach der Menge des gebildeten Ammoncarbonats bestimmt, und zwar folgender Formel gemäß: $(NH_2)_2CO + 2\,H_2O = (NH_4)_2CO_3$.

†) Die Differenz zwischen der hinzugefügten und der vergorenen Harnstoffmenge liegt in den Fehlergrenzen der Analyse.

schiedenen harnstoffspaltenden Bakterien entdeckt[1]). Aber nach *Beijerinck*[2]) können einige Bakterien, die keine Urease bilden, auch Harnstoff zersetzen. Dies beobachtete er in den Kulturen lichtproduzierender Meeresbakterien (Photobacter luminosum, Photobacter indicum und bei den Varietäten des letzteren, Photobacter splendidum und Photobacter splendor maris). Für solche Erscheinungen, bei denen die Funktion des Ferments durch eine katalytische Wirkung des

[1]) *Pasteur* und *Joubert*, C. r. Acad. Scienc. **88**, 5, 1876; *P. Miquel*, Ann. d. micrograph. **5**, 371, 1893; C. r. Acad. Scienc. **111**, 397, 1890; *W. Leube*, Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **100**, 540, 1895; *M. W. Beijerinck*, Centralbl. f. Bakt. **2**, 7, 33, 1901; *J. Moll*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 344, 1902; *M. Jacoby*, diese Zeitschr. **84**, 354, 1917.

[2]) *M. W. Beijerinck*, Centralbl. f. Bakt. **2**, 7, 33, 1901.

Tabelle II.

Dreitägige Kultur des Urobac. hesmogenes in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig zersetzt worden ist. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2 n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs	
		Versuch ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anfang des Versuchs	a	19,0			
	b		1. 19,0		
	c				
	d		2. 3,0		
	e				
	f				
Nach 3 Std.	b	52,4		200,4	
	c	52,35	1. 19,0	200,1	
	d	52,35	2. 3,0	200,1	200,16
	e	52,3		199,8	
	f	52,4		200,4	

Tabelle III.

Fünftägige Kultur des Urobact. amylovorum in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig zersetzt worden ist. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2 n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs	
		Versuch ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anfang des Versuchs	a	18,7			
	b				
	c		1. 18,7		
	d				
	e		2. 3,0		
	f				
Nach 3 Std.	b	52,0		199,8	
	c	52,05	1. 18,7	200,1	
	d	52,1	2. 3,0	200,4	200,16
	e	52,1		200,4	
	f	52,05		200,1	

lebenden Plasmas ersetzt wird, schlug *Beijerinck* die Benennung Katabolismus vor. *Benecke*[1]) erhob die Frage, ob die Bildung von Milch-, Essig-, Butter- usw. Säure das Werk von Enzymen auch bei solchen Formen sei, welche diese Stoffe nur vorübergehend und in geringfügigem Maße ausbilden. Seiner Meinung nach ist es wohl auch möglich, daß da, wo derartige Stoffe nur in kleiner Menge gebildet

[1]) *Wilhelm Benecke*, Bau und Leben der Bakterien, S. 445, 1912.

Tabelle IV.

Sechstägige Kultur des Urobact. citrophilum in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig zersetzt worden ist. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs	
		Versuch ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anfang des Versuchs	a	18,6			
	b				
	c		1. 18,6		
	d				
	e		2. 3,0		
	f				
Nach 3 Std.	b	52,0		200,4	
	c	51,9	1. 18,6	199,8	
	d	51,95	2. 3,0	200,1	199,9
	e	51,9		199,8	
	f	51,9		199,8	

Tabelle V.

Siebentägige Kultur des Urobact. aerophilum in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig zersetzt worden ist. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs	
		Versuch ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anfang des Versuchs	a	18,5			
	b				
	c		1. 18,5		
	d				
	e		2. 2,9		
	f				
Nach 3 Std.	b	41,5		138,0	
	c	41,3	1. 18,5	136,8	
	d	41,45		137,7	137,2
	e	41,3	2. 2,85	136,8	
	f	41,3		136,8	

werden, das lebende Protoplasma selbst ihre Bildung bewirkt und nur da, wo große Mengen auftreten, Enzyme ausbildet und tätig sein läßt.

Im Zusammenhang damit war es nicht ohne Interesse zu erklären, ob die Urobakterien des Chadjibeylimans, zwischen denen, wie oben gezeigt, nicht nur kräftige, sondern auch relativ schwache Harnstoffspalter vorhanden sind, Urease bilden. Die in dieser Richtung angestellten Versuche bestanden darin, daß die Keime in den Bouillonkulturen dieser Bakterien durch Toluol abgetötet wurden. Nach dem

Tabelle VI.

Sechstägige Kultur der Urosarc. psychrocarterica in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff, in der der letztere völlig zersetzt worden ist. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I.

Zeit	Parallele	Menge der 0,2n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs mg	
		Versuch ccm	Kontrollen ccm		
Anfang des Versuchs	a	18,7			
	b		1. 18,65		
	c				
	d				
	e		2. 3,0		
	f				
Nach 3 Std.	b	52,0	1. 18,7	199,8	
	c	52,0		199,8	
	d	52,05	2. 3,0	200,1	200,04
	e	52,1		200,4	
	f	52,05		200,1	

Zusatz von Harnstoff wurden dann diese Kulturen in einen Thermostaten bei dem Temperaturoptimum der Urease (45 bis 47° C) gestellt. Im Falle der Harnstoffzersetzung könnte man das Vorhandensein von Urease in diesen Kulturen als bewiesen betrachten. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle I bis VI angeführt.

Die Harnstoffzersetzung in den in Tabelle I bis VI angeführten Versuchen weist darauf hin, daß alle oben genannten Bakterien in Fleisch-Peptonbouillon mit 1 Proz. Harnstoff Urease bilden.

Es ist bekannt, daß die Zusammensetzung des Nährmediums einen Einfluß auf die Fermentbildung bei Bakterien ausübt. Die letzteren erzeugen manchmal bestimmte Fermente nur dann, wenn für diese Fermente ein Bedürfnis entsteht, und hören wieder auf sie zu produzieren, wenn ihr Vorhandensein nicht mehr nötig ist.

So z. B. bildeten in den Versuchen von *Brunton* und *Mac Fayden*[1]) die im Medium mit Stärke aufgewachsenen Bakterien Amylase, nicht aber in solchem mit Gelatine ohne Stärke. *Wortmann*[2]) beobachtete Amylasebildung durch Bakterien nur dann, wenn Stärke als einzige Kohlenstoffquelle diente. Schon eine Spur von weinsaurem Ammon verhinderte die Stärkeassimilation. Im Dextrosemedium produziert Bac. amylobacter keine Cytase[3]). Nach *Fermi*[4]) findet bei verschiedenen Fäulnisbakterien die Proteasenbildung in eiweißlosen Substraten nicht statt.

---

[1]) *Brunton* und *Mac Fayden*, Proc. Roy. Soc. **46**, 542, 1889.
[2]) *Wortmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **6**, 287, 1882.
[3]) *W. Pfeifer*, Ber. Sächs. Ges. math.-phys. Kl. 1896, S. 513.
[4]) *Fermi*, Centralbl. f. Bakt. **10**, 13, 1891.

Im Zusammenhang damit verdient die Frage, ob Bakterien Urease auch bei Nichtvorhandensein von Harnstoff bilden, Aufmerksamkeit. Da die Urobakterien des Chadjibeylimans, außer der Urosarcina psychrocarterica, auf gewöhnlicher Bouillon ohne Harnstoff- oder Ammoncarbonatzusatz nicht gedeihen, so wurden sie in Bouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$ bei 20 bis 24° C kultiviert.

Tabelle VII.

Zehntägige Kulturen in Fleisch-Peptonbouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle I, nur die Kulturen werden nach fünfstündigem Stehen im Thermostaten (bei 45 bis 47° C) abtitriert. Als erste Kontrolle dient eine von diesen Kulturen mit Toluol, aber ohne Harnstoffzusatz. Als zweite Kontrolle wird sterile Fleisch-Peptonbouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$ verwendet.

Zeit	Benennung der Bakterien	Parallele	Menge der 0,2n HCl, die zur Neutralisation von je 10 ccm Flüssigkeit erforderlich war		Menge des zersetzten Harnstoffs	
			Versuch ccm	Kontrollen ccm	mg	
Anf. des Versuchs			4,05	1. 4,05 2. 3,0		
Nach 5 Std.*)	Urobac. psychrocartericus	a	11,55		45,0	
		b	11,05	1. 4,05	42,0	
		c	11,75		46,2	44,64
		d	11,75	2. 3,0	46,2	
		e	11,35		43,8	
	Urobac. hesmogenes	a	9,05		30,0	
		b	9,0		29,7	
		c	8,9		29,1	29,64
		d	8,9		29,1	
		e	9,1		30,3	
	Urobact. amylovorum	a	8,5		26,7	
		b	8,55		27,0	
		c	8,7		27,9	26,94
		d	8,4		26,1	
		e	8,55		27,0	
	Urobact. citrophilum	a	7,15		18,6	
		b	7,3		19,5	
		c	7,2		18,9	19,14
		d	7,2		18,9	
		e	7,35		19,8	
	Urobact. aerophilum	a	6,65		15,6	
		b	6,7		15,9	
		c	6,85		16,8	15,9
		d	6,45		14,4	
		e	6,85		16,8	
	Urosarc. psychrocarterica	a	6,5		14,7	
		b	6,45		14,4	
		c	6,6		15,3	14,88
		d	6,6		15,3	
		e	6,5		14,7	

*) Die Menge des zersetzten Harnstoffs erreichte nach 5 Stunden ihr Maximum.

Wie aus Tabelle VII ersichtlich, fand die Harnstoffzersetzung in den Ammoncarbonatbouillonkulturen der oben genannten Bakterien, in welchen alle Keime durch Toluol abgetötet worden waren, statt. Also bildeten diese Bakterien Urease auch bei Nichtvorhandensein von Harnstoff. Jedoch war die Menge des gebildeten Ferments nicht groß, weil in je 10 ccm der Bouillonkultur nur folgende Quantitäten Harnstoff vergoren wurden:

Bei dem	Urobac. psychrocartericus	44,64 mg
„ „	Urobac. hesmogenes	29,64 „
„ „	Urobact. amylovorum	26,94 „
„ „	Urobact. citrophilum	19,14 „
„ „	Urobact. aerophilum	15,9 „
„ der	Urosarc. psychrocarterica	14,88 „

Da die Urosarcina psychrocarterica in gewöhnlicher, gegen Lackmus alkalischer Fleisch-Peptonbouillon sogar ohne Ammoncarbonat- oder Harnstoffzusatz wächst, so wurde ihre Kultur in diesem Medium auch auf Urease untersucht. Die Resultate erwiesen sich als positive, und zwar zersetzten je 10 ccm dieser Kultur, in der alle Keime durch Toluol abgetötet worden waren, etwa 15 mg Harnstoff.

Weitere Untersuchungen über Ureasebildung bei Nichtvorhandensein von Harnstoff bestanden darin, daß die in Fleisch-Peptonbouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$ aufgewachsenen Urobakterien in ein Medium von derselben Zusammensetzung überimpft wurden, daraus, nachdem sie sich dort entwickelt hatten, wieder in ebensolches harnstoffloses Medium usw. Auf diese Weise wurden fünf nacheinanderfolgende Generationen dieser Bakterien erhalten, deren Ureasebildungsfähigkeit untersucht wurde. Jede Generation war 10 Tage alt (Tabelle VIII).

Wie aus Tabelle VIII ersichtlich, entkräftigte sich das Ureasebildungsvermögen bei fünf nacheinanderfolgenden, in harnstofflosem Medium aufgewachsenen Generationen dieser Bakterien nicht merklich.

In den oben geschilderten Versuchen wurde Urease in alten, zehntägigen Kulturen konstatiert. Es war aber von Interesse, die Ureasebildung bei Nichtvorhandensein von Harnstoff in einer Abhängigkeit vom Alter der Bakterienkulturen zu untersuchen.

Dazu wurden die Urobakterien des Chadjibeylimans in Fleisch-Peptonbouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$ bei 20 bis 24° C kultiviert; zu je 100 ccm in 150-ccm-Erlenmeyerkolben. Daraus wurden täglich, vom Anfang der merklichen Bakterienentwicklung an, je 10 ccm Flüssigkeit genommen und auf Urease in der schon oben beschriebenen Weise analysiert. Die Resultate dieser Analyse sind in Tabelle IX angeführt.

Tabelle VIII.

Zehntägige Kulturen in Fleisch-Peptonbouillon mit 0,1 Proz. $(NH_4)_2CO_3$. Dieselben Versuchsbedingungen wie in Tabelle VII.

Benennung der Bakterien	Parallele	Menge des in je 10 ccm Medium zersetzten Harnstoffs				
		1. Generation mg	2. Generation mg	3. Generation mg	4. Generation mg	5. Generation mg
Urobac. psychrocarticus	a	45,0	42,5	43,5	46,0	43,2
	b	44,0	46,1	44,6	43,0	46,1
	c	42,3 44,7	45,0 44,62	44,5 44,5	44,5 44,7	46,2 44,5
	d	46,0	43,5	45,3	44,5	44,0
	e	44,2	46,0	44,6	44,5	43,0
Urobac. hesmogenes	a	30,1	29,4	28,7	29,1	30,1
	b	27,4	29,6	28,9	30,2	29,8
	c	29,6 29,46	30,1 29,62	29,9 29,08	30,3 29,4	29,4 29,5
	d	30,2	30,1	29,9	29,0	29,1
	e	30,0	28,9	28,0	28,4	29,1
Urobact. amylovorum	a	26,9	27,1	26,4	26,7	27,1
	b	26,8	27,0	25,8	25,9	27,0
	c	27,1 26,52	25,8 26,6	25,9 26,04	26,1 26,14	27,0 26,8
	d	25,8	26,1	25,4	26,1	26,1
	e	26,0	26,0	26,7	25,9	26,8
Urobact. citrophilum	a	19,1	19,4	19,4	17,0	19,0
	b	18,4	20,0	19,8	16,3	18,8
	c	18,6 18,8	19,0 19,16	19,1 19,26	19,0 17,34	18,6 19,22
	d	19,0	18,0	19,0	17,4	19,6
	e	18,9	19,4	19,0	17,0	20,1
Urobact. aerophilum	a	16,1	12,4	13,6	13,0	15,9
	b	15,8	11,8	14,2	12,0	16,3
	c	15,7 15,8	12,2 12,32	14,2 13,94	13,6 13,4	16,1 15,88
	d	15,7	13,3	13,8	14,0	15,7
	e	15,7	11,9	13,9	14,4	15,4
Urosarc. psychrocarterica	a	15,1	13,4	13,6	15,2	14,7
	b	14,8	13,6	14,0	14,3	15,4
	c	14,7 14,78	13,2 13,72	13,7 13,86	14,3 14,36	15,1 14,86
	d	14,7	15,0	13,8	14,0	14,7
	e	14,6	13,6	14,2	14,0	14,4

Tabelle IX.

Alter der Bakterienkulturen Tage	Menge des in je 10 ccm Medium zersetzten Harnstoffs					
	Urobac. psychrocart. mg	Urobac. hesmogenes mg	Urobact. amylovorum mg	Urobact. citrophilum mg	Urobact. aerophilum mg	Urosarc. psychrocart. mg
1	5,3	4,9	4,0	1,2	—	—
2	39,9	20,1	19,05	8,7	0,3	—
3	44,8	29,6	26,7	17,3	3,7	0,6
4	44,8	29,55	26,7	19,25	8,1	6,4
5	44,8	29,6	26,65	19,25	14,05	12,95
6	—	—	—	19,2	15,6	14,0
7	—	—	—	—	15,6	14,7
8	—	—	—	—	15,6	14,65
9	—	—	—	—	—	14,7
10	44,8	29,6	26,7	19,25	15,55	14,7

Wie Tabelle IX zeigt, erreichte die Menge der gebildeten Urease ihr Maximum

bei	dem	Urobac. psychrocartericus . .	in	3	tägiger	Kultur
„	„	Urobac. hesmogenes	„	3	„	„
„	„	Urobact. amylovorum	„	3	„	„
„	„	Urobact. citrophilum	„	4	„	„
„	„	Urobact. aerophilum	„	6	„	„
„	der	Urosarc. psychrocarterica . . .	„	7	„	„

Aus allem Vorhergehenden kann man zum Schluß kommen, daß die Urobakterien des Chadjibeylimans Urease sogar bei solchen Bedingungen produzieren, bei welchen dieses Ferment eine Anwendung für seine Wirkung nicht findet. Analoge Beispiele, die sich auf einige andere Fermente beziehen, sind in der bakteriologischen Literatur vorhanden. So z. B. bildet der Bac. prodigiosus und der Bac. pyocyaneus ein proteolytisches Ferment auf eiweißfreiem Medium mit Glycerin[1]). *Fermi* und *Montesano*[2]) beobachteten die Invertaseerzeugung bei Nichtvorhandensein von Saccharose. Nach *Katz*[3]) bildet der Bac. subtilis Diastase nur bei Gegenwart von Pepton usw. In diesen Fällen werden die Bakterien verschwenderisch, indem sie Fermente ausbilden, für deren Entstehung kein Bedürfnis vorliegt.

---

[1]) *C. Fermi*, Centralbl. f. Bakt. **10**, 13, 1891.
[2]) *C. Fermi* und *G. Montesano*, ebendaselbst II, **1**, 482, 1895.
[3]) *O. Katz*, ebendaselbst **9**, 157, 1891.

Über die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker in vitro.

Von

Elisabeth Müller.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Hamburger Universität, Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 20. Juni 1926.)

Eine Reihe von Autoren hat in letzter Zeit die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß die Permeabilität der roten Blutkörperchen für Zucker durch Insulin verändert wird. Die ersten Versuche in dieser Richtung bringen *Häusler* und *Löwi*[1]), die an Fluoridblut arbeiteten. Ähnliche Angaben macht neuerdings *Secker*[2]).

Es erhebt sich die Frage, ob diese Wirkung des Insulins von prinzipieller Bedeutung für die Erklärung des Mechanismus der Insulinwirkung ist. Man müßte annehmen, daß, genau wie die roten Blutkörperchen, auch die anderen Zellen des Organismus für Zucker durchlässig werden und dadurch der Zucker aus dem Blute in die Gewebe verschwände. Wäre dies der Fall, so müßte also unter Insulin zwar der Zuckergehalt des Blutes, nicht jedoch der Zucker der Gewebe abnehmen, letzterer müßte sogar unter Umständen zunehmen. Um darüber Auskunft zu erhalten, stellten wir folgenden Versuch an:

Einer Ratte wird aus der Schwanzvene Blut zur Blutzuckerbestimmung und gleichzeitig unter Chloräthyl-Spray ein Stück Muskulatur des Oberschenkels entnommen. Die Ratte bekommt dann Insulin subkutan und wird 2 Stunden später getötet.

Die Resultate dieser Versuche zeigt die Tabelle I.

Tabelle I.

	Ratte I, 230 g		Ratte II, 200 g	
	Blutzucker Proz.	Muskelzucker Proz.	Blutzucker Proz.	Muskelzucker Proz.
Vor Insulin	0,182	0,119	0,140	0,138
Nach Insulin	0,052	0,078	0,049	0,084

[1]) Pflügers Arch. **210**, 238, 1925.
[2]) Journ. of Physiol. **60**, 286, 1925.

Aus ihr geht hervor, daß nicht nur der Blutzucker, sondern auch der Zuckergehalt des an Masse größten Organs, der Muskulatur, unter Insulinwirkung abnimmt. Zu einem ähnlichen Resultat kommen übrigens auch *Lesser*, *Bissinger* und *Zipf* in ihren Versuchen, aus denen hervorgeht, daß nicht nur der Blutzucker, sondern der Zucker des ganzen Körpers unter Insulin abnimmt. Es ist also unmöglich, das Wesen der Insulinwirkung auf Permeabilitätsänderungen der Zellen ohne weitere Hilfshypothesen allein zurückzuführen.

Eine andere Frage ist, wie man sich zu der Tatsache der Permeabilitätsänderung überhaupt stellen soll. Die Permeabilität der roten Blutkörperchen ist bekanntlich durch sehr viele Agenzien sehr leicht zu beeinflussen, so daß jahrzehntelang sich die ernsthaftesten Untersucher über die scheinbar so einfache Frage stritten, ob die roten Blutkörperchen Zucker enthalten oder nicht. Der Zustand der kernlosen, roten Blutkörperchen der Säugetiere ist offenbar so labil, daß schon die geringsten Einflüsse ihre Zellmembran weitgehendst beeinflussen. Sehr viel ähnlicher in ihren Lebenserscheinungen den übrigen Zellen des Körpers sind die kernhaltigen Blutkörperchen der Vögel. An ihnen wurden einige Versuche über die Zuckerpermeabilität angestellt.

Es wurde dabei das Blut (Gänseblut) mit einer kleinen Menge Ringer (0,2 ccm auf 10 ccm Blut: Kontrolle) bzw. mit der gleichen Menge insulinhaltigem Ringer versetzt. Das Blut wurde zum Teil in relativ kurzer Zeit (etwa 15 Minuten), zum Teil nach zweistündigem Stehen im Brutschrank bei 37° verarbeitet. Günstig war dabei besonders die Tatsache, daß Gänseblut in dieser Zeit keine Glykolyse zeigt. Wir benutzten fast immer Blut, das durch Rühren mit einem Glasstab defibriniert war. In einigen Fällen, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind, die aber die gleichen Resultate ergaben, benutzten wir Oxalatblut.

Tabelle II.

Defibriniertes Gänseblut. Auf 100 ccm Gänseblut 8 Einheiten Insulin *Boots*.

Datum	Normalblut		Insulinblut				Bemerkungen
	Blutzucker	Serumzucker	Blutzucker	Serumzucker	nach Insulin im Blute Zuckerzunahme	nach Insulin im Serum Zuckerzunahme	
12. X.	0,147	0,199	0,148	0,195	+ 0,001	— 0,004	
22. X.	0,165	0,215	0,161	0,211	— 0,004	— 0,004	
30. X.	0,144	0,208	0,142	0,205	— 0,002	— 0,003	Dasselbe Blut, nachdem es 2 Stdn. bei 38° war
30. X.	0,143	0,206	0,140	0,207	— 0,003	+ 0,001	
27. X.	0,147	0,185	0,151	0,180	+ 0,004	— 0,005	Sofort
27. X.	0,156	0,181	0,147	0,183	— 0,009	+ 0,002	Nach 2 Stunden Brutschrank
20. XI.	0,147	0,202	0,149	0,206	+ 0,002	+ 0,004	Sofort
20. XI.	0,139	0,191	0,142	0,189	+ 0,003	— 0,002	Nach 2 Stunden Brutschrank
23. XI.	0,142	0,178	0,143	0,176	+ 0,001	— 0,002	Sofort
23. XI.	0,139	0,161	0,137	0,159	+ 0,002	— 0,002	Nach 2 Stunden Brutschrank

Aus unseren Versuchen (s. Tabelle II) ergibt sich klar, daß durch Insulin der Zuckergehalt des Blutes und des Blutserums nur innerhalb der Fehlerquellen der *Hagedorn-Jensen*schen Blutzuckermethode verändert wird, und zwar liegen die Ausschläge manchmal nach der negativen, manchmal nach der positiven Seite. Die Permeabilität der Gänseblutkörperchen für Zucker wird also durch Insulin nicht beeinflußt.

Secker[1]) hat angegeben, daß durch Insulin nicht nur die Permeabilität für Zucker, sondern auch für Kochsalz geändert wird. Wir haben auch diese Versuche an Gänse- und Hundeblut nachgeprüft und erhielten zuerst widersprechende Resultate. Erst als wir daran gingen, das Blut jeweils mit Luft zu sättigen und dadurch eine konstante CO_2-Tension im Blute erzielten, bekamen wir gleichmäßige Resultate, die in Tabelle III niedergelegt sind. Der konstante CO_2-Gehalt ist deswegen notwendig, weil bei abnehmender CO_2-Spannung Cl-Ionen aus den Blutkörperchen in das Serum wandern. Wir bestimmten das Kochsalz im Blute wie im Serum nach der Methode von *Ruszniak*, die uns im allgemeinen gute Resultate gab.

Tabelle III.

Datum	Normalblut, NaCl-Proz.			Insulinblut, NaCl-Proz.			Bemerkungen
	Blutart	Blut	Serum	Blut	Serum	Insulin in 100 ccm Blut Einheiten	
19. X.	Hund	0,571	0,796	0,573	0,744	8	
20. X.	„	0,541	0,732	0,524	0,721	8	
22. X.	Gans	0,553	0,700	0,534	0,694	3,8	Luftgesättigt
23. X.	„	0,487	0,629	0,501	0,624	3,8	
23. X.	„	0,503	0,627	0,499	0,620	3,8	Nach 2 Stdn. Brutschrank
23. X.	Hund	0,525	0,758	0,501	0,738	3,8	Luftgesättigt
26. X.	„	0,501	0,740	0,514	0,782	8	„
27. X.	Gans	0,505	0,629	0,501	0,620	8	„
27. X.	„	0,521	0,647	0,507	0,638	8	Luftgesättigt, nach 2 Stdn. Brutschrank
29. X.	„	0,534	0,700	0,525	0,702	20	
30. X.	„	0,507	0,661	0,492	0,655	10	

Die Kochsalzwerte im Blute und Serum zeigt Tabelle III; sie sind innerhalb der Fehlergrenzen die gleichen mit und ohne Insulinzusatz mit einer Ausnahme (Versuch vom 26. Oktober 1925), bei dem der Unterschied allerdings umgekehrt ist, als man nach der Theorie von *Secker* annehmen könnte. Einen Einfluß des Insulins auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen für Kochsalz haben wir also nicht feststellen können.

[1]) l. c.

Von einigen Forschern wird angenommen, daß Insulin die Fähigkeit besitzt, in Gegenwart von Muskel- oder Leberbrei die Glykolyse des Blutes zu verstärken. So machen *E. F. Müller*, *H. Wiener* und *R. Wiener*[1]) diese „bekannten Versuche" zum Ausgangspunkt weitgehender Erörterungen. Wir haben einige Beobachtungen angestellt, um diese Frage zu klären.

Unsere ersten Versuche stellten wir so an, daß wir in einem *Lapatie*schen Zerkleinerungsapparat Stückchen einer Hundeleber, die ganz frisch einem durch Entbluten getöteten Hunde entnommen war, zu Brei preßten und eine kleine Menge dieses Breies zu der 25fachen Menge frischen Blutes desselben Hundes zusetzten. Es fand sich nun in diesen Blutproben überhaupt keine Glykolyse, wenn man sie einige Stunden im Brutschrank stehen ließ, sondern im Gegenteil eine Erhöhung des Blutzuckers. Offenbar war also im Leberbrei noch eine beträchtliche Glykogenolyse eingetreten, die die Glykolyse des Blutes verdeckte. Ein Unterschied zwischen diesen Blutproben und denen, die gleichzeitig noch mit Insulin versetzt waren, war nicht zu erkennen. Wir haben es daher vorgezogen, statt Leberbrei Muskelbrei zu benutzen, wobei wir die Versuchsanordnung genau so ließen wie bei den Versuchen mit Leberbrei.

Muskelbreiversuche.

1. Versuch vom 2. Dezember.

a) 10 ccm Hundeblut + 0,4 ccm Muskelbrei + 0,2 ccm physiologischer NaCl-Lösung.

b) 10 ccm Hundeblut + 0,4 ccm Muskelbrei + 0,2 ccm 10proz. Insulin in physiologischer NaCl-Lösung (auf 100 ccm Blut 4 Einheiten Insulin).

	Sofort		1 Stunde im Brutschrank	
	Blutzucker Proz.	Serumzucker Proz.	Blutzucker Proz.	Serumzucker Proz.
Kontrolle	0,108	0,131	0,058	0,032
Insulin	0,110	0,130	0,054	0,032

2. Versuch vom 10. März.

a) 10 ccm Hundeblut + 0,5 ccm Muskelbrei + 0,4 ccm physiologischer NaCl-Lösung.

b) 10 ccm Hundeblut + 0,5 ccm Muskelbrei + 0,4 ccm 10proz. Insulin in physiologischer NaCl-Lösung (auf 100 ccm Blut 8 Einheiten Insulin).

	Sofort Blutzucker Proz.	2 Stdn. im Brutschrank Blutzucker Proz.
Kontrolle	0,121	0,063
Insulin	0,125	0,064

[1]) Münch. med. Wochenschr. 26/27, 1925.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß ein Unterschied in der Glykolyse zwischen den Proben mit und ohne Insulin nicht besteht, ferner, daß auch bei dieser Versuchsanordnung die Verteilung des Zuckers zwischen Körperchen und Serum nicht verändert wird.

Zusammenfassung.

1. Die Permeabilität der Gänseerythrocyten für Traubenzucker und für Cl-Ionen wird durch Insulin nicht beeinflußt.

2. Während der Insulinhypoglykämie sinkt auch der Zuckergehalt der Gewebe.

3. Die Glykolyse des Blutes bei Gegenwart von Muskelbrei wird durch Insulin nicht beeinflußt.

Autorenverzeichnis.

Abelin, I. Zur Kenntnis des Kohlehydratstoffwechsels. I. Mitteilung: Über die Bedeutung des Phosphats für den Umsatz der Kohlehydrate. S. 274.

Blaschko, Hermann. Über den Mechanismus der Blausäurehemmung von Atmungsmodellen. S. 68.

Borgert, H. und *K. Keitel.* Über die vasokonstriktorischen Substanzen im Blutserum. S. 1.

Brahdy, B. s. *Th. Brehme.*

Brehme, Th. und *B. Brahdy.* Zur Frage der Milchsäurebestimmung in kleinen Blutmengen, Modifikation der Clausenschen Methode. S. 348.

Brugsch, Theodor, Melanie Cahen und *Hans Horsters.* Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVIII. Mitteilung: Die Spaltung der Zymohexosediphosphorsäure durch die Muskulatur und ihr Spaltprodukt die Monohexosephosphorsäure. S. 120.

Brugsch, Theodor und *Hans Horsters.* Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVI. Mitteilung: Glykolyse und Glykometamorphose, unter besonderer Berücksichtigung des Insulins. S. 90.

— — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XVII. Mitteilung: Myophosphat. S. 115.

— — Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XIX. Mitteilung: Zum Mechanismus der Insulinwirkung. S. 127.

Brugsch, Theodor und *Hans Horsters.* Studien über intermediären Kohlehydratumsatz. XX. Mitteilung: Der Wasserstoffexponent p_H des Vollblutes nach Insulininjektion beim Kaninchen. S. 130.

Cahen, Melanie s. *Theodor Brugsch.*

Dische, Zacharias und *Daniel Laszlo.* Über das glykolytische Vermögen tierischer Organe beim Carcinom. S. 412.

Dische, Zacharias und *Hans Popper.* Über eine neue kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode der Kohlehydrate in Organen und Körpersäften. S. 371.

Fehér, D. und *S. Vági.* Untersuchungen über die Einwirkung von Na_2CO_3 auf Keimung und Wachstum der Pflanzen. II. S. 172.

Fellenberg, Th. von und *Gulbrand Lunde.* Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur. X. Mitteilung: Beitrag zur Geochemie des Jods. S. 162.

Fischer, Anton. Zur Bestimmung des Fettsäuregehalts von Organen. S. 449.

Fuchs, Hans J. Über proteolytische Fermente im Serum. II. S. 185.

Groák, B. Mikrogesamtjodbestimmung und Jodbestimmung in organischen Säuren. S. 455.

Grünbaum, A. s. *J. Snapper.*

Hägglund, Erik und *Truls Rosenqvist.* Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. V. S. 293.

Hartmann, Max und *Hans Isler.* Zur Kenntnis des Ovarialhormons. S. 46.

Hergloz, Eugen. Neuere Untersuchungen über den Jodgehalt der Schilddrüse. S. 175.

Horsters, Hans s. *Theodor Brugsch.*

Isler, Hans s. *Max Hartmann.*

Iwanoff, Nicolai N. Über Harnstoff bei Bakterien. S. 181.

Jacoby, Martin. Zur Kenntnis der Bedeutung der Blausäure bei der Metallvergiftung der Enzyme. S. 79.

Jendrassik, L. und *E. Moser.* Die Calciumionisation in physiologischen Lösungen. S. 461.

Kanamori, Torao. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß vitaminreicher, mineralstoffarmer Ernährung auf den Stoffwechsel und die Lage des Harnquotienten C : N. S. 318.

— Notiz über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei der Phenylhydrazinanämie. S. 330.

Keitel, Karl. Über den Einfluß der experimentellen Säurevergiftung und der Nebennierenexstirpation auf die anorganischen Kationen des Blutserums. S. 86.

Keitel, K. s. *H. Borgert.*

Klopstock, E. s. *J. Wohlgemuth.*

Köhler, Marialuis. Versuche über die Wirksamkeit der Nebenschilddrüsenauszüge des Handels. S. 27.

Kosterlitz, Hans und *Helmut Petow.* Einige Beobachtungen über das Verhalten der Esterase bei der Autolyse der Leber. S. 31.

Laszlo, Daniel s. *Zacharias Dische.*

Lunde, Gulbrand s. *Th. von Fellenberg.*

Masuda, Toshio. Über die Wirkung diuretischer Gifte auf die cyanvergiftete Froschniere. S. 8.

Moser, E. s. *L. Jendrassik.*

Müller, Elisabeth. Über die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker in vitro. S. 491.

Nakamura, Yasuo s. *J. Wohlgemuth.*

Okuyama, Yoshimori. Versuche über die Empfindlichkeit der Blutgefäße des Frosches gegen Adrenalin. S. 18.

Petow, Helmut s. *Hans Kosterlitz.*

Pewsner, G. s. *O. Steppuhn.*

Popper, Hans s. *Zacharias Dische.*

Prát, Silvestr. Die Anwendung der polarographischen Methodik in der Biologie. S. 268.

Rona, Peter und *Margot Sperling.* Untersuchungen über den Blutzucker. X. Mitteilung: Über die Verteilung der Glucose auf Plasma und Blutkörperchen. S. 253.

Rosenqvist, Truls s. *Erik Hägglund.*

Rubentschik, L. Über Ureasebildung durch Bakterien bei Nichtvorhandensein von Harnstoff. S. 482.

Snapper, J. und *A. Grünbaum.* Über den β-Oxybuttersäuregehalt von Muskeln und Leber. S. 366.

— — Über die Methodik der β-Oxybuttersäurebestimmung in Leber und Muskeln. S. 357.

Sperling, Margot s. *Peter Rona.*

Steppuhn, O., G. Pewsner und *A. Timofejewa.* Über das Wesen der Autolyse. VI. Mitteilung: Die Autoproteolyse ganzer Tierkörper unter verschiedenen Bedingungen. S. 471.

Takane, Kazuji. Über die vermeintliche Hydrolyse der Stärke durch Salze und Eiweißabbauprodukte. S. 241.

Theorell, A. Hugo T. Über quantitative Bestimmung der Lipoide der aus Pferdeplasma ausgesalzten Eiweißkörper. S. 297.

Timofejewa, A s. *O. Steppuhn.*

Vági, S. s. *D. Fehér.*

Wada, Hideo. Über den Einfluß der Fütterung mit aktivem und inaktivem Eisenoxyd auf den Harnquotienten C : N beim Kaninchen. S. 62.

Wohlgemuth, J. Die Fermente der Haut. V. Atmung und Glykolyse der Haut und ihre Beeinflussung durch Hormone. Von *E. Klopstock* S. 202.

— Die Fermente der Haut. VI. Über das Verhalten der Lipase und über das Vorkommen von Phosphatase, Sulfatase und Carboxylase in der Haut. Von *Yasuo Nakamura.* S. 216.

Wohlgemuth, J. und *Y. Nakamura.* Über den Zuckerabbau im Zentralnervensystem des Menschen. S. 233.

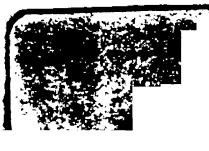
Zelinsky, N. D. und *Sch. R. Zinzadze.* Eine neue Methode der quantitativen Fettbestimmung in der tierischen Substanz und in ganzen Organismen. S. 335.

Zeller, Heinrich. Wirkung von Ammonsalzen auf die Hefegärung. IV. S. 135.

Zinzadze, Sch. R. s. *N. D. Zelinsky.*

STACKS

141750



STACKS

141750